

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

Nariane de Andrade

**RELAÇÃO ENTRE AS EMISSÕES DE N₂O E A EXPRESSÃO DOS
GENES DO CICLO DO NITROGÊNIO EM UM SOLO CULTIVADO
COM MILHO SOBRE RESÍDUO DE ERVILHACA**

Santa Maria, RS
2022

Nariane de Andrade

RELAÇÃO ENTRE AS EMISSÕES DE N₂O E A EXPRESSÃO DOS GENES DO CICLO DO NITROGÊNIO EM UM SOLO CULTIVADO COM MILHO SOBRE RESÍDUO DE ERVILHACA.

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de concentração Biodinâmica e Manejo do Solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência do Solo**.

Orientador: Rodrigo Josemar Seminoti Jacques

Santa Maria, RS
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Andrade, Nariane de
Relação entre as Emissões de N₂O e a Expressão dos Genes do Ciclo do Nitrogênio em um Solo Cultivado com Milho sobre Resíduos de Ervilhaca / Nariane de Andrade.- 2022.
63 p.; 30 cm

Orientador: Rodrigo Josemar Seminoti Jacques
Coorientador: Sandro José Giacomini
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo, RS, 2022

1. Desnitrificação 2. Óxido Nitroso 3. nirK 4. nosZ 5. Déficit Hídrico I. Jacques, Rodrigo Josemar Seminoti II. Giacomini, Sandro José III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

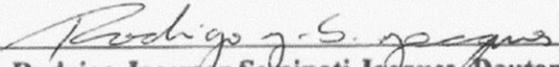
Declaro, NARIANE DE ANDRADE, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

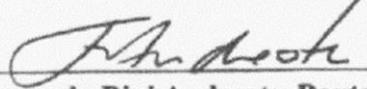
Nariane de Andrade

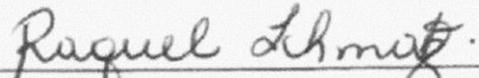
**RELAÇÃO ENTRE AS EMISSÕES DE N₂O E A EXPRESSÃO DOS GENES DO
CICLO DO NITROGÊNIO EM UM SOLO CULTIVADO COM MILHO SOBRE
RESÍDUO DE ERVILHACA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de concentração Biodinâmica e Manejo do Solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência do Solo**.

Aprovado em 04 de fevereiro de 2022


Rodrigo Josemar Seminoti Jaques, Doutor (UFSM)
(Presidente/ Orientador)


Fernando Dini Andreote, Doutor (ESALQ/ USP)


Raquel Schmatz, Doutora (Yara Brasil Fertilizantes)

Santa Maria, RS
2022

*Aos meus pais, Fredolino (in memoriam) e Ivanir.
Dedico este trabalho!*

AGRADECIMENTOS

Há muito o que agradecer!

Gostaria de iniciar agradecendo a minha mãe Ivanir de Andrade, por todo o apoio emocional e financeiro durante estes 2 anos de estudos. Ao meu pai, Fredolino Vanderley de Andrade (*in memoriam*) que mesmo não estando presente de forma física, deixou um legado de honestidade e amor que carrego comigo todos os dias.

Ao meu namorado e grande companheiro Vitório Londero Pagliarin por ser paz e luz em meio a dias difíceis durante esta trajetória.

Ao meu irmão Willian e cunhada Diuliana por todo o apoio e companheirismo e ao meu “pequeno grande” sobrinho Pedro Miguel por ser a esperança de dias melhores.

Aos meus avós, Doni, Cema (*in memoriam*), Leopoldo e Leontina, por me mostrarem que apesar das dificuldades, devemos lutar pelo que acreditamos, e que isso transforma o futuro de toda uma família.

Aos meus padrinhos, Floraci e Valdomiro, agradeço por serem grandes companheiros de nossa família, por nos apoiarem em momentos difíceis e por serem a minha segunda família, em quem confio e sei que posso recorrer. Aos demais tios e primos, agradeço o apoio de sempre, eu sou uma pessoa muito abençoada por ter pessoas tão especiais ao meu lado.

Aos meus sogros, Claudia e Fernando, cunhado Lorenzo e cunhada Fernanda, por me acolherem tão bem na família e por se tornarem o meu principal refúgio em Santa Maria.

Ao meu orientador e amigo Rodrigo Jacques, agradeço a parceria e o companheirismo durante este tempo. Foram anos desafiadores, cresci enquanto pessoa e profissional. Agradeço por acreditar no meu potencial e por me ajudar com boas conversas em momentos difíceis.

Ao meu co-orientador Sando Giacomini e ao grande professor Jansen Santos, agradeço todo o auxílio e ajuda intelectual durante este tempo.

A minha orientadora de Iniciação científica e minha inspiração como mulher na ciência, Zaida Inês Antonioli. Obrigada pelo companheirismo e bons exemplos.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia do Solo: Antônio, Bruno, Darlyng, Eduarda, Igor, Isac, João, Joice, Leonardo, Lisiane, Lucas, Mariana, Mylla, Natieo, Tiana e Valéria. Agradeço a ajuda durante todo o período de experimento e pela amizade que construímos durante estes anos de convívio.

De forma muito especial, agradeço a amizade e apoio da minha grande amiga Isabelle Scheffer e a Raquel Schmatz, pois foram companheiras incansáveis desta jornada, me ajudando profissionalmente e psicologicamente.

Aos meus amigos/irmãos da graduação: Airton, Amanda e Rosana. Agradeço por se tornarem referência de amizade e companheirismo e por me mostrarem que o tempo pode passar, mas que a nossa amizade permanece sempre intacta e cada vez mais fortalecida.

Aos amigos do Laboratório de Biotransformação do Carbono e Nitrogênio: Adriani, Caren, Douglas, Fernanda, Getúlio, Heitor, Pâmela, Roberta e Steffen. Agradeço a recepção calorosa no grupo de pesquisa e todo o apoio prestado durante este tempo de mestrado.

Às minhas amigas e companheiras de apartamento, Roberta e Dhenefer, agradeço as boas conversas e intensas risadas compartilhadas após os cansativos dias de trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e a CAPES pelo apoio financeiro.

*“While some consider the N-cycle to be fiendishly complicated,
I prefer to think of it as deliciously complex.”*

Codispoti, L. (pers. commun.) apud Zehr & Kudela (2011)

RESUMO

RELAÇÃO ENTRE AS EMISSÕES DE N₂O E A EXPRESSÃO DOS GENES DO CICLO DO NITROGÊNIO EM UM SOLO CULTIVADO COM MILHO SOBRE RESÍDUO DE ERVILHACA.

AUTORA: Nariane de Andrade

ORIENTADOR: Rodrigo Josemar Seminoti Jacques

COORIENTADOR: Sandro José Giacomini

A adição de resíduos de leguminosas para cobertura do solo no sistema de plantio direto pode aumentar as emissões de N₂O. Porém, quando há déficit hídrico e cultivo de gramíneas em sucessão, a atividade dos microrganismos desnitrificantes e as emissões podem ser menores. O presente trabalho teve o objetivo de quantificar as emissões de N₂O de um solo cultivado em plantio direto com milho sobre diferentes quantidades de resíduos de ervilhaca, em condições de déficit hídrico e relacionar com a dinâmica da expressão de genes chaves do ciclo do N da comunidade desnitrificante do solo. Para isto, foi instalado um experimento a campo, onde o milho foi cultivado sobre 0, 3, 6 e 9 Mg MS ha⁻¹ de *Vicia villosa* Roth. Durante 161 dias foram quantificadas no solo as emissões de N₂O e CO₂, os teores de N mineral, umidade, temperatura, decomposição dos resíduos, além dos teores de C e N nas plantas. O RNAm do solo das datas com maiores emissões de N₂O foi extraído e utilizado para o estudo da expressão relativa dos genes *nirK* e *nosZ*. As emissões acumuladas de N₂O foram semelhantes entre os tratamentos com resíduos (média de 0,645 kg ha⁻¹). As plantas de milho absorveram N (66, 83 e 103 kg ha⁻¹) proporcionalmente à quantidade de resíduo depositada na superfície do solo. Com isto houve redução da disponibilidade de N mineral no solo, o que conjuntamente com o déficit hídrico, resultou em baixas emissões acumuladas de N₂O. A expressão dos genes *nirK* e *nosZ* por esta comunidade é menor quando há maiores de emissões de N₂O no solo.

Palavras-chave: Desnitrificação. Óxido nitroso. *nirK*. *nosZ*. Déficit hídrico.

ABSTRACT

RELATIONSHIP BETWEEN N₂O EMISSIONS AND THE EXPRESSION OF NITROGEN CYCLE GENES IN A SOIL CULTIVATED WITH MAIZE ON VETCH RESIDUE.

AUTHOR: Nariane de Andrade
ADVISOR: Rodrigo Josemar Seminoti Jacques
CO-ADVIDOR: Sandro José Giacomini

Addition legume residues as cover crops may increase soil N₂O emissions under no-tillage system. However, when there is water deficit and grass cultivation in succession, the activity of denitrifying microorganisms and emissions may be lower. This study aimed to quantify the N₂O emissions from a soil cultivated with maize under no-tillage, covered with different amounts of vetch residues, and under water deficit conditions, and to relate the N₂O emissions with the expression of key genes of denitrifying soil communities. Therefore, a field experiment was set up to cultivate maize on residues of *Vicia villosa* Roth. at 0, 3, 6, and 9 Mg MS ha⁻¹. During 161 days, the emission of N₂O and CO₂, mineral N, moisture, temperature, decomposition of residues were quantified. In addition, the levels of C and N in the plants were also analysed. For the dates with the highest N₂O emissions, the soil mRNA was extracted and used to study the relative expression of the *nirK* and *nosZ* genes. The accumulated emissions of N₂O were similar between the treatments with residues of *V. villosa* (on average 0.645 kg ha⁻¹). The maize plants absorbed N (66, 83, and 103 kg ha⁻¹) proportionally to the amount of residue deposited on the soil surface. As a result, there was a reduction in the availability of soil mineral N, which associated with the water deficit, resulted in low accumulated emissions of N₂O. The expression of *nirK* and *nosZ* genes by this soil community is lower when the soil N₂O emission increases.

Keywords: Denitrification. Nitrous oxide. *nirK*. *nosZ*. Water deficit.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 - Ciclo do N simplificado com a indicação das enzimas e genes chaves dos processos de nitrificação e desnitrificação. 16

ARTIGO

FIGURA 1 - Precipitações pluviométricas diárias (a) e valores de EPSA para as camadas de 0-0,05 m (b) e 0,05-0,10 m (c) observadas ao longo de 161 dias de experimento onde o milho foi cultivado sob 0, 3, 6 e 9 Mg ha⁻¹ de resíduo de ervilhaca. As barras verticais indicam a diferença mínima significativa entre tratamentos (Tukey P<0,05). 35

FIGURA 2 - Dinâmica do NH₄⁺-N (a, c), NO₃⁻-N (b, d) e N mineral (e, f) no solo nas camadas de 0 – 0,05 m (a, c, e) e 0,05 – 0,10 m (b, d, f) em 21 dias de coleta ao longo de 161 dias de experimento onde o milho foi cultivado sobre 0, 3, 6 e 9 Mg ha⁻¹ de resíduo de ervilhaca em condições de baixa disponibilidade hídrica. As barras verticais indicam a diferença mínima significativa entre tratamentos (Tukey P<0,05). 37

FIGURA 3 – Fluxos de N-N₂O (a) e C-CO₂ (b) e quantidades acumuladas de N₂O (c) e CO₂ (d) durante 161 dias de experimento em que o milho foi cultivado sobre 0, 3, 6 ou 9 Mg ha⁻¹ de resíduo de ervilhaca em condições de baixa disponibilidade hídrica. As barras verticais indicam a diferença mínima significativa entre tratamentos (Tukey P<0,05). **Erro! Indicador não definido.** 39

FIGURA 4 - Expressão gênica relativa dos genes desnitrificantes *nirK* (a e b) e *nosZ* (c e d) nas datas de 2 (a e c) e 28 (b e d) dias após o início do experimento, onde ocorreram as maiores emissões de N₂O do solo de um experimento onde o milho foi cultivado sobre 0, 3, 6 ou 9 Mg ha⁻¹ de resíduo de ervilhaca em condições de baixa disponibilidade hídrica. As barras de erros verticais indicam o desvio padrão entre amostras. 40

MATERIAL SUPLEMENTAR

FIGURA 1S – Temperatura média compensada do ar durante 161 dias de experimento..... 61

FIGURA 2S - Precipitação média do verão em relação a normal climatológica (1980-2010) para a região de Santa Maria, RS, Brasil..... 62

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

TABELA 1 - Primers utilizados para amplificar genes funcionais que codificam enzimas chaves do ciclo do N por RT-qPCR.....	32
TABELA 2 - Teores de N adicionados ao solo, emitidos como N ₂ O, acumulados como N nos tecidos e produtividade do milho cultivado sobre diferentes quantidades de resíduo de ervilhaca em condições de baixa disponibilidade hídrica.	41

MATERIAL SUPLEMENTAR

TABELA 1S - Condições utilizadas nas reações de RT-qPCR para cada par de primer.	60
TABELA 2S - Volumes e concentrações de reagentes utilizadas nas reações de RT-qPCR para cada par de primer.	60
TABELA 3S – Teores de C acumulados nos tecidos do milho cultivado sobre diferentes quantidades de resíduo de ervilhaca em condições de baixa disponibilidade hídrica.	61
TABELA 4S - Influência de anomalias na precipitação na região de Santa Maria, RS, Brasil.....	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	13
1.1	REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1.1	O ciclo do N e seus múltiplos processos	15
1.1.2	Os genes funcionais do “moderno” ciclo do N	19
1.1.3	Contribuições da agricultura para a emissão de N ₂ O	20
1.1.4	Fatores que influenciam as emissões de N ₂ O	21
1.2	HIPÓTESE	24
1.3	OBJETIVO GERAL.....	24
1.3.1	Objetivos específicos.....	24
2	RELAÇÃO ENTRE AS EMISSÕES DE N₂O E A EXPRESSÃO DOS GENES DO CICLO DO NITROGÊNIO EM UM SOLO CULTIVADO COM MILHO SOBRE RESÍDUO DE ERVILHACA.....	25
2.1	RESUMO	25
2.2	INTRODUÇÃO.....	25
2.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.3.1	Local e solo	28
2.3.2	Tratamentos e delineamento experimental	28
2.3.3	Decomposição e liberação de C e N pela ervilhaca.....	29
2.3.4	Emissões de N ₂ O e CO ₂	29
2.3.5	Fatores ambientais do solo e dados meteorológicos	30
2.3.6	Determinação do C e N totais do milho e cálculo da produtividade.....	30
2.3.7	Quantificação da expressão relativas de genes chaves do ciclo do N.....	30
2.3.8	Análise dos dados.....	32
2.4	RESULTADOS	33
2.4.1	Condições ambientais.....	33
2.4.2	Decomposição dos resíduos da ervilhaca.....	35
2.4.3	Dinâmica do N mineral no solo	36
2.4.4	Emissões de N ₂ O e CO ₂	38
2.4.5	Expressão dos genes	39
2.4.6	Teores de N nas plantas e emitido na forma de N ₂ O.....	41
2.5	DISCUSSÃO.....	41
2.6	CONCLUSÃO.....	48
2.7	AGRADECIMENTOS	48

2.8	REFERÊNCIAS	48
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
4	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO GERAL

O solo desempenha diversas funções fundamentais para a manutenção da vida no Planeta. Dentre elas, é o principal reservatório de biodiversidade da Terra, regula os fluxos de gases de efeito estufa (GEE), participa do ciclo hidrológico, é a base para a produção agrícola, além de biocombustíveis e fibras (KOPITTKE et al. 2019) entre outros. Devido a sua importância, os demais compartimentos ambientais (atmosfera, hidrosfera, biosfera, etc) são afetados pelo uso e manejo do solo. Um exemplo disto é que a utilização de fertilizantes nitrogenados na agricultura que podem impactar nas emissões globais dos GEEs (SMEETS et al. 2009). Dentre os GEEs com maior relevância, estão o gás carbônico (CO_2) devido a quantidade emitida e o óxido nitroso (N_2O) pelo seu potencial de aquecimento que, é 265 vezes maior que o do CO_2 com base em um período de 100 anos (IPCC, 2014). Além destes, o metano (CH_4) tem grande importância mas em locais específicos, como nos solos alagados e na pecuária.

O N_2O é emitido do solo para a atmosfera a partir dos processos de nitrificação e desnitrificação, realizados por ampla variedade de microrganismos, como bactérias e archaeas nitrificantes e desnitrificantes, e alguns fungos (HAYATSU et al. 2008). A nitrificação ocorre em condições aeróbicas, emitindo N_2O como subproduto do processo de oxidação da amônia a nitrato (NO_3^-). Na ausência de oxigênio no solo, a ocorrência de desnitrificação é favorecida, onde microrganismos anaeróbicos facultativos utilizam o NO_3^- como aceptores alternativos de elétrons (REGAN et al. 2017), podendo ocasionar em aumento da emissão de N_2O , dependendo da ocorrência de uma série de fatores ambientais, como por exemplo da disponibilidade de carbono (C), nitrogênio (N) (ZHU et al. 2021), umidade e oxigenação (MOSIER et al. 2002). Estes fatores podem ser alterados pelas ações antropogênicas e aumentar a emissão de N_2O pelas denominadas fontes biogênicas, como exemplo os microrganismos. As práticas agrícolas como adubação, revolvimento, compactação, adição de resíduos de culturas, irrigação, etc, são capazes de alterar estes fatores, que por sua vez afetam a atividade dos microrganismos e consequentemente modificam os fluxos de GEEs.

A disponibilidade de N mineral do solo pode ser aumentada pela adição de fertilizantes nitrogenados (orgânicos e sintéticos) ou pelo aporte de resíduos culturais de leguminosas, fixadoras de N_2 . Os fertilizantes nitrogenados são amplamente utilizados na agricultura, porém aproximadamente 50% do montante aplicado não é aproveitado pelas plantas devido a alguns processos como lixiviação e emissão de gases (MOSIER et al. 2002; KOPITTKE et al. 2019).

Por isto, aumentar o percentual de aproveitamento do N pelas culturas agrícolas deve diminuir as perdas para o ambiente. A capacidade de melhor utilizar o N do solo de uma espécie vegetal dependerá de suas características genéticas, capacidade de fixação de N₂ e das propriedades do solo (FLORIO et al. 2014).

Um dos princípios do sistema plantio direto é o uso de plantas de cobertura devido aos seus benefícios tanto para o solo, quanto para a produção agrícola. No entanto, este sistema através de suas premissas, pode aumentar as emissões de gases do N para a atmosfera, já que confere ao solo maior densidade aparente devido ao não revolvimento e maior disponibilidade de C orgânico oriundo das plantas de cobertura (MOSIER et al. 2002). Um manejo que adicione grande quantidade de resíduos culturais sobre o solo pode fornecer altas quantidades de C e N orgânico, manter alta umidade após eventos de precipitação, estabilizar a temperatura e ocasionar aumentos dos fluxos do N₂O do solo. Por isto, os resíduos culturais e a sua influência nas emissões de N₂O vem tornando-se foco de diversos trabalhos em diferentes condições experimentais (BROZYNA et al. 2013; PINHEIRO et al. 2019; LASHERMES et al. 2022). Porém ainda são escassos os resultados sobre as emissões de N₂O no milho (*Zea mays* L.) cultivado após a ervilhaca (*Vicia villosa* Roth e *Vicia sativa* L.), sucessão muito utilizada pelos produtores rurais da região subtropical do Brasil. A ervilhaca cultivada no outono/inverno acumula, através da fixação biológica do N₂ (FBN), quantidades significativas de N que após seu manejo e durante o processo de decomposição, é mineralizada e torna-se disponível ao milho cultivado em sucessão (primavera/verão). O milho requer grande quantidade deste nutriente para seu desenvolvimento, o que tende a reduzir as emissões de N₂O, pois menor quantidade de N estará disponível para os microrganismos.

Devido à complexidade dos fatores envolvidos na emissão de N₂O, inúmeros estudos já foram desenvolvidos a fim de melhor entender as interações biológicas, ambientais e de manejo responsáveis por este processo (BAYER et al. 2015; PINHEIRO et al. 2019; SCHMATZ et al. 2020), no entanto, apresentaram resultados divergentes. Uma alternativa para estes estudos é a utilização de técnicas moleculares capazes de quantificar genes funcionais chaves nos processos de nitrificação e desnitrificação, como *amoA*, *nirK*, *nirS*, *norB* e *nosZ*, que são responsáveis por codificar enzimas envolvidas na oxidação de amônia, produção e consumo de N₂O (BRAKER e CONRAD, 2011; BUTTERBACH BAHL et al. 2013). Pesquisas nesta temática auxiliarão a compreender melhor o efeito das práticas agrícolas sobre a atividade dos microrganismos desnitrificantes e nitrificantes e sua consequência nas emissões de N₂O pelo solo.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 O ciclo do N e seus múltiplos processos

Nossa compreensão sobre o ciclo do N está em constante evolução e por ser um nutriente importante para a agricultura, desperta interesse e atenção de muitos pesquisadores (Figura 1). Cerca de 80% da atmosfera é constituída pelo gás dinitrogênio (N_2), porém esta forma não é assimilável por grande parte dos seres vivos, a não ser por microrganismos procariotos diazotróficos (bactérias e archeas) através da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (GRAHAM et al. 2011; CORREA-GALEOTE et al. 2014). Este processo fornece às plantas e a outros microrganismos um dos nutrientes mais importantes para a manutenção da vida na Terra, já que o N é parte de proteínas, ácidos nucleicos, hormônios, etc. A FBN mais estudada é a simbiótica entre microrganismos e plantas leguminosas, seguida pela FBN de vida livre que também é um importante processos de fixação de N nos solos (van GROENINGER et al. 2015), mas que ainda necessitam melhor compreensão.

a demanda de N das plantas simbiontes, porém nos cultivos agrícolas parte do N provém do solo. Após a fixação de N_2 via FBN, a amônia estará disponível para a utilização pelas plantas e microrganismos, portanto a FBN faz parte da amonificação. Além da FBN, também fazem parte do processo de amonificação a redução do nitrito anaeróbico assimilatório (ANRA) e dissimilatório (DNRA)(STEIN & KLOTZ, 2016). Após a morte das plantas e dos microrganismos, o N presente nos resíduos culturais e nas células microbianas sofre o processo de mineralização, produzindo amônia em mais um processo que compõe a amonificação. A mineralização de N é alterada principalmente pelo N orgânico do solo, e por isso, as taxas de mineralização dependem da quantidade e qualidade da matéria orgânica (MO), disponibilidade de substrato, umidade e razão C:N do solo e da biomassa microbiana (BOOTH et al. 2005). Assim como no solo, as culturas de coberturas com menor relação C:N tende a estimular maiores taxas de mineralização. A amônia oriunda da mineralização da MO, resíduos culturais e células microbianas influencia as taxas de nitrificação (BOOTH et al. 2005).

No solo, a amônia poderá ser oxidada para nitrato (NO_3^-) via nitrificação, o qual é um processo aeróbico e realizado por microrganismos quimiolitotróficos. Neste processo, inicialmente a amônia é oxidada em hidroxilamina (NH_2OH) e a após a NH_2OH é convertida em nitrito (NO_2^-) (CORREA-GALEOTE et al. 2014). Por fim, o NO_2^- oxidado à NO_3^- , por meio da nitratação (STEIN & KLOTZ, 2016). A nitrificação é um processo realizado principalmente por Bactérias, porém desde 2005 foi descoberto a importância das Archaea neste processo (KÖNNEKE et al. 2005).

A nitrificação foi por muito tempo um processo caracterizado pela ocorrência de duas etapas bem fundamentadas e separadas, no entanto, descobertas recentes por técnicas moleculares, evidenciou que bactérias pertencentes ao gênero *Nitrospira* são capazes de realizar a nitrificação completa, pois possuem uma maquinaria genética capaz de oxidar por completo a amônia até NO_3^- (DAIMS et al. 2015). À esta nitrificação completa foi dado o nome de “comammox” para referenciar os “oxidantes completos de amônia”, porém, este termo foi incorporado ao conhecimento do ciclo do N no estudo de Costa et al. (2006), quando a nitrificação completa ainda era desconhecida. Stein & Klotz (2016) abordaram em sua revisão o processo comammox. Durante a nitrificação, se a disponibilidade de O_2 no solo estiver abaixo de um nível ótimo pode ocorrer a emissão de N_2O como um subproduto da reação (FARQUHARSON e BALDOCK, 2007) e através da nitrificação desnitrificante (HAYATSU et al. 2008). Em resumo, a nitrificação desnitrificante refere-se à redução dissimilatória do NO_2^- em N_2O em baixas concentrações de O_2 (van GROENINGEN et al. 2015; STEIN & KLOTZ,

2016). Por fim, pode haver emissão de N_2O de forma abiótica, como por exemplo, a partir da oxidação de NH_2OH na presença de metais, como o ferro (SU et al. 2019).

Com o N na forma de NO_3^- , este pode ser novamente absorvido pelas plantas ou continuar e ser reduzido até N_2 , via desnitrificação. Na ausência de O_2 , os microrganismos anaeróbicos facultativos e obrigatórios irão utilizar o NO_3^- ou NO_2^- como aceptores finais de elétrons na respiração (ZEHR & KUDELA, 2011). O gás N_2 é o produto final da desnitrificação, tendo como intermediários importantes gases, como o NO e N_2O (BERNHARD, 2010). Para que as reações de desnitrificação sejam iniciadas, há a necessidade de que no solo ocorra baixa disponibilidade de oxigênio (O_2) (alto valor de EPSA), pelas zonas de anaerobiose formadas dentro de agregados ou resultado de um alto consumo de O_2 devido a alta atividade microbiana e radicular. Aliado a essa condição, as taxas de desnitrificação são determinadas pela disponibilidade de C lábil e de NO_3^- no solo. Há 4 etapas no processo de desnitrificação: a primeira etapa está ligada a redução do NO_3^- para NO_2^- , através da ação da enzima nitrato redutase; a segunda etapa reduz o NO_2^- para óxido nítrico (NO), através da ação da enzima nitrito redutase; a terceira etapa é a responsável pela produção de N_2O , a partir da redução do produto da etapa anterior mediado pela enzima óxido nítrico redutase (CORREA-GALEOTE et al. 2014). Por fim, a etapa final de desnitrificação, reduz o N_2O em N_2 pela ação da enzima óxido nitroso redutase, altamente sensível ao oxigênio (MOSIER et al. 2002), emitindo para a atmosfera este gás que pode ser novamente utilizado para a FBN, reiniciando o ciclo do N.

A desnitrificação pode ser realizada por diversos microrganismos: bactérias desnitrificantes, fungos e archaeas (HAYATSU et al. 2008). Além disso, o N_2O pode ser emitido através da atividade de bactérias Anammox (capazes de emitir N_2 a partir de reações entre NH_4^+ e NO_2^- na ausência de O_2) (HAYATSU et al. 2008). Diante disso, a importância dos procaríotos no ciclo do N é bem conhecida e cada vez mais estudada e valorizada. No entanto, a desnitrificação e codenitrificação fúngica ainda necessitam melhor entendimento em solos agrícolas. A codenitrificação foi determinada a partir do estudo desenvolvido por Tanimoto et al. (1992), utilizando o fungo *Fusarium oxysporum*. Atualmente sabe-se que pode ocorrer pela ação de bactérias e fungos. É um processo caracterizado pela produção de N_2O e N_2 a partir de diferentes compostos de N, como ácido salicilhidroxâmico e azida (N_3^-), porém, necessita do NO_2^- ou NO_3^- como indutores das reações de desnitrificação (TANIMOTO et al. 1992). Tamanha a importância da codenitrificação fúngica, por exemplo, que o estudo laboratorial desenvolvido por Long et al. (2013) demonstrou que em alguns solos agrícolas dos Estados Unidos este processo pode ser um dos principais responsáveis pela perda de N a partir da emissão de N_2 . Rex et al. (2018), ao estudar em experimento laboratorial solos de pastagens

com solução de uréia ($0,55 \text{ mg mL}^{-1}$) em simulação à urina, também evidenciaram que os fluxos totais de N_2O e os oriundos da codenitrificação foram predominantes da atividade fúngica.

Diante do exposto é perceptível a complexidade dos processos envolvidos no ciclo do N. Muitos destes processos brevemente citados podem ser confundidos e sobrepostos quando avaliados no ambiente, por isso, estudar este ciclo é um instigante desafio. Através da evolução da pesquisa e dos métodos utilizados, foi possível compreender fatores e agentes envolvidos na ciclagem do N. No entanto, devido a importância deste nutriente para a manutenção da vida, pesquisas devem ser incentivadas a fim de melhor entender todos os processos envolvidos, possibilitando a mitigação de gases poluentes, diminuição da contaminação de lençóis freáticos e economia do produtor a partir do aumento da eficiência do uso do N pelas plantas.

1.1.2 Os genes funcionais do “moderno” ciclo do N

Embora estejamos nos referindo aos genes funcionais do “moderno” ciclo do N, eles já estão sendo estudados e mencionados a algum tempo (ZUMFT, 1997; NÉMETH et al. 2014; LINTON et al. 2020). Para que as complexas reações bioquímicas do ciclo do N sejam adequadamente realizadas, faz-se necessário que ampla variedade de enzimas estejam funcionais, a fim de realizar todas as reações (CORREA-GALEOTE et al. 2014) (Figura 1). Estas enzimas são codificadas por genes específicos e que necessitam ser estudados pois são capazes de auxiliar para o adequado entendimento do ciclo do N e suas reações (HAYATSU et al. 2008). A expressão dos genes é um dos indicadores que nos auxilia a entender como e quando os processos biológicos irão acontecer. A falta de O_2 , por exemplo, é uma condição necessária para que a expressão de genes específicos seja iniciada e assim a desnitrificação torne-se ativa. Stein & Klotz (2016) abordam em uma revisão que muitas espécies de microrganismos não possuem todos os genes necessários para conduzir até a completa desnitrificação, podendo desta forma resultar na emissão de N_2O .

A expressão dos genes pode ser conhecida como o estudo da presença e da quantidade de RNA mensagem (RNAm) presente na célula. A vida curta do RNAm faz com que ele seja um ótimo indicador da expressão gênica, a qual pode ser relacionada com as emissões de N_2O . As técnicas de Reação em Cadeia de Polimerase Quantitativa (qPCR) (SUREY et al. 2020) e Reação em Cadeia de Polimerase Quantitativa com transcrição reversa (RT-qPCR) estão sendo amplamente utilizadas no estudo da expressão dos genes que codificam a síntese de importantes enzimas do ciclo do N (CORREA-GALEOTE et al. 2014; NÉMETH et al. 2014). Como no trabalho de Linton et al. (2020) que utilizou qPCR e RT-qPCR para estudo dos genes *16S rRNA*,

amoA, *nirS*, *nirK*, *nosZ1* e *nosZ2* ao relacionar a abundância e a transcrição destes genes com as emissões de N₂O em um solo com adubação nitrogenada e diferentes manejos.

A FBN ocorre devido a ação da enzima nitrogenase, codificada através da expressão dos genes *nifH*, *nifD*, *nifG* and *nifK* (ZEHR & KUDELA, 2011). Já a abundância de bactérias anammox pode ser realizada a partir dos genes *hzor*, como no trabalho de Long e colaboradores (2013). As bactérias que são capazes de realizar a nitrificação possuem genes chaves para a realização do processo, como o *amoA* responsável pela codificação da monooxigenase de amônia e o *hao* capaz de codificar a hidroxilamina oxiredutase (BOCK & WAGNER, 2006).

Assim como a nitrificação, o processo de desnitrificação necessita de um complexo aparato molecular, o qual é expresso em condições ambientais específicas. A enzima nitrato redutase codificada pelos genes *nar* ou *nap*, são os principais responsáveis pelo início da desnitrificação (CORREA-GALEOTE et al. 2014). Após, ocorre a redução de NO₂⁻ para NO, decorrente da ação da enzima nitrito redutase, a qual é codificada pelos genes *nir*, como o *nirK* (contendo cobre) e *nirS* (ZUMFT, 1997). A produção de N₂O por bactérias a partir da redução de NO, para posterior emissão à atmosfera ou redução até N₂ é realizada pela enzima óxido nítrico redutase, codificada pelo gene *Nor* e suas variações, como por exemplo os genes do complexo *cnor* (*norC* e *norB*) e o *qnor* (HENDRIKS et al. 2000). Por fim, a redução de N₂O para N₂ é mediado pela óxido nitroso redutase, codificada pelo gene *nosZ* (van GROENINGER et al. 2015). Sugere-se que alterações na expressão do gene *nosZ* possam modificar a emissão final de N₂O, sendo que maiores expressões podem aumentar a emissão de N₂ e reduzir a de N₂O. Porém, a complexidade do ciclo do N reflete-se na sua complexidade a nível molecular, o que torna difícil a obtenção de informações científicas que se apliquem de forma geral aos microrganismos e aos ambientes. Tudo isto torna difícil muitas vezes estabelecer relações mais precisas entre os processos moleculares e as quantificações dos compostos produzidos no ciclo do N em experimentos de laboratório e de campo.

1.1.3 Contribuições da agricultura para a emissão de N₂O

As emissões de óxido nitroso (N₂O) para a atmosfera é um problema que tem recebido cada vez mais atenção, pois com o aumento da concentração deste gás na atmosfera, há redução da camada de ozônio que protege o planeta (GRAHAM et al. 2011) e o agravamento do efeito estufa através da absorção da radiação térmica terrestre. Segundo o Boletim WMO de Gases de Efeito Estufa (2019), o solo é um dos principais responsáveis pelo aumento das concentrações de N₂O na atmosfera, sendo evidenciado que as concentrações atmosféricas deste gás

registradas em 2018 é aproximadamente 123% maior do que em relação ao verificado em épocas não industriais, ou seja, antes de 1750.

A agricultura tem papel importante na emissão de N_2O , principalmente pelo uso do solo e da fertilização nitrogenada. O N é um importante nutriente para a produção agrícola e as principais formas para suprir a alta demanda das plantas é através da FBN e da aplicação de fertilizantes nitrogenados. A utilização de fertilizantes nitrogenados teve início em 1909 a partir do processo Haber-Bosch (produção de amônia de forma artificial) (SMITH et al. 2020). Este foi um grande marco para o aumento da produção agrícola, mas desencadeou o uso irracional deste recurso. A fertilização química em sistemas agrícolas, assim como outras ações antrópicas, como a deposição de resíduos de plantas e aplicação de dejetos de animais ao solo pode alterar a emissão de N_2O de forma direta (HERGOUALC'H et al. 2019), pois são capazes de modificar a composição e a atividade da comunidade microbiana do solo. Rincón e colaboradores (2012) abordam em revisão de literatura que o gene *nifH*, por exemplo, pode sofrer um decréscimo em sua diversidade quando há um incremento na fertilização química, já que este é um importante codificador da enzima nitrogenase responsável pela FBN.

Sempre que o N for adicionado ao solo, ficará disponível à comunidade microbiana e poderá ser usado nos processos relacionados a produção de N_2O , dependendo das condições ambientais (GOMES et al. 2009). Uma forma de diminuir a emissão deste gás é aportar ao solo apenas a quantidade de N que será utilizada pela planta (KOPITTKKE et al. 2019), independente da fonte do nutriente. O manejo racional do solo e da fertilização nitrogenada mitigará a emissão de gases poluentes do efeito estufa, assim como outros problemas ambientais, como a contaminação de recursos hídricos através da lixiviação de NO_3^- . A lixiviação de NO_3^- para áreas adjacentes de sua origem ou deposição, pode provocar a emissão de N_2O de forma indireta (BASCHÉ et al. 2014), o que é ambientalmente problemática e economicamente cara, ao produtor rural e conseqüentemente à sociedade.

1.1.4 Fatores que influenciam as emissões de N_2O

Assim como a lixiviação e a volatilização, os processos biológicos de nitrificação e desnitrificação são responsáveis pelas perdas de N no solo. Essas perdas tornam-se a cada ano mais acentuadas devido ao intenso uso de fertilizantes nitrogenados pela agricultura e são determinantes na regulação da eficiência do uso do N pelas plantas (RÜTTING et al. 2018). Quanto maiores as perdas de N para o ambiente em relação ao que foi adicionado, menor é a eficiência deste nutriente. Todos os processos envolvidos na perda de N, como por exemplo a

emissão de N_2O através da nitrificação e desnitrificação, são reguladas por fatores ambientais e de gestão. Os principais fatores da produção de N_2O na nitrificação são a disponibilidade de NH_4^+ e condições subótimas de O_2 e na desnitrificação são a ausência de O_2 , a disponibilidade de NO_3^- e de C lábil. O adequado conhecimento destes fatores é fundamental para a mitigação das emissões do N_2O .

Manejes que visem a eliminação dos pousios, desenvolvimento constante de culturas sobre o solo e escalonamento da aplicação de fertilizantes nitrogenados são adequados a fim de minimizar as perdas gasosas e lixiviação de N (MOSIER et al. 2002), já que um dos principais fatores de emissão do N_2O é a presença de N no solo em quantidades acima da demanda das culturas. Nesta situação, os altos teores de NO_3^- podem lixiviar, ocasionando emissão indiretas de N_2O , ou seja, em ambientes afastados do local de uso do N (BASCHÉ et al. 2014).

Inúmeros estudos apontam a quantidade de N e a relação C:N dos resíduos culturais de plantas de cobertura (especialmente leguminosas) como principais fatores responsáveis pela emissão de N_2O em solos (PIMENTEL et al. 2015; SCHMATZ et al. 2020). Weiler et al. (2018) correlacionaram positivamente os teores de N e C solúveis com as emissões cumulativas de N_2O , em experimento com culturas de cobertura de verão. No entanto, um estudo recente conduzido em laboratório, verificou que características como a quantidade de componentes solúveis em detergente neutro (ex. carboidratos de cadeia curta) pode ser a característica química mais importante a ser considerada em um resíduo, sendo que altos valores resultam em altas emissões de N_2O (LASHERMES et al. 2022).

O C mineralizável aportado por culturas de cobertura pode ser considerado outro importante fator na regulação de taxas de emissão de N_2O . Mitchell et al. (2013) em experimentos de campo, evidenciaram que a deposição de uma cultura de cobertura (centeio) aumentou as emissões de N_2O em tratamentos com níveis intermediários de fertilização nitrogenada, não diferindo estatisticamente da maior taxa de fertilização. Isso geralmente ocorre quando o teor NO_3^- não é limitante e há baixa concentração de O_2 em solos agrícolas (MITCHELL et al. 2013). Estes mesmos autores, em experimento laboratorial adicionando a este solo fertilizado níveis de KNO_3 e glicose, verificaram que o aumento na emissão de N_2O ocorreu em maior magnitude nos tratamentos em que foi adicionado a glicose ao solo, demonstrando a importância do C mineralizável quando há aporte de NO_3^- para os processos microbianos. Além disso, altas concentrações de C fornece energia e estimula a atividade dos microrganismos, reduzindo a oxigenação do solo devido ao aumento da respiração microbiana (FARQUHARSON e BALDOCK, 2007). Estes sítios de anaerobiose são um dos responsáveis pela emissão de N_2O via desnitrificação em solos aerados.

A disponibilidade de O_2 é outro fator chave, já que a desnitrificação é um processo anaeróbico. Após eventos de precipitação pluviométrica, a emissão de N_2O tende a tornar-se mais intensa, já que com a entrada de água no perfil solo, há a saída de oxigênio (MOSIER et al. 2002; BUTTERBACH BAHL et al. 2013). Assim, o teor de umidade e a disponibilidade de O_2 no solo estão diretamente relacionados ao aumento do fluxo do N_2O . Estudos verificaram que culturas de cobertura sobre o solo influencia a umidade do solo (SCHMATZ et al. 2020), principalmente na camada superficial e após eventos de precipitação, conforme demonstrado também com canteiro na rotação milho-soja (BASCHÉ et al. 2016). Desta forma, a disponibilidade de O_2 , que pode ser alterada pelo manejo do solo e atividade microbiana, é um dos principais reguladores dos principais processos emissores de N_2O , a nitrificação e desnitrificação (PETERSON et al. 2011). A temperatura influencia a atividade microbiana do solo e por consequência as emissões de N_2O . Guzman et al. (2015) utilizaram diferentes quantidades de resíduo de colheita de milho em sistemas de preparo do solo convencional e plantio direto e verificaram que na maior quantidade de resíduos no plantio direto, a temperatura do solo foi em média $2,2^\circ C$ menor que as menores quantidades de resíduos.

Muitos estudos têm buscado modificar a dinâmica do ciclo do N com a utilização de inibidores de nitrificação em diferentes condições experimentais (WU et al. 2017; QUEMADA et al. 2019), relacionando inclusive a aplicação de inibidores com os genes responsáveis pela codificação de algumas enzimas do ciclo do N (TOSI et al. 2020). Os inibidores de nitrificação atuam na enzima urease, que é responsável por catalisar a hidrólise da ureia em NH_3 e CO_2 (MOSIER et al. 2002). A manutenção do N na forma de NH_4^+ , através do uso de inibidores de nitrificação, além de prolongar o fornecimento do N às plantas, diminui a lixiviação e a emissão de N_2O devido a redução de processos microbianos (QIAO et al. 2015). A partir da análise de 62 estudos, Qiao et al. (2015) verificaram que o uso de inibidores de nitrificação diminuiu a perda líquida de N em aproximadamente 16%. Estes resultados foram possíveis devido a redução da lixiviação de N e emissões de NO e N_2O . No solo há elevada heterogeneidade e a desnitrificação é a média da desnitrificação ativa que está ocorrendo em todos os microsítios do solo (PARKIN, 1987). Além disso, a variabilidade de combinações entre os fatores acima discutidos é imensa, possibilitando que microsítios sejam mais favoráveis ou desfavoráveis para os processos de nitrificação e desnitrificação, e conseqüentemente emissão de N_2O .

1.2 HIPÓTESE

- 1) A emissão de N_2O aumenta com o aumento da quantidade de resíduo de ervilhaca *Vicia villosa* depositada sobre o solo.
- 2) A absorção de N mineral pelas plantas de milho reduz a sua disponibilidade no solo e por consequência as emissões de N_2O .
- 3) Há diferentes níveis de expressão dos genes chaves do ciclo do N nos diferentes níveis de emissões de N_2O .

1.3 OBJETIVO GERAL

Quantificar as emissões de N_2O de um solo cultivado em plantio direto com milho sobre diferentes quantidades de resíduos de ervilhaca, em condições de baixa disponibilidade hídrica e relacionar com a dinâmica da expressão de genes chaves do ciclo do N da comunidade desnitrificante do solo.

1.3.1 Objetivos específicos

- 1) Quantificar as emissões de N_2O do solo cultivado com milho sobre diferentes quantidades de resíduo de ervilhaca, em condições de déficit hídrico;
- 2) Avaliar como a absorção do N mineral resultante dos resíduos de ervilhaca pelas plantas de milho afetam as emissões de N_2O do solo;
- 3) Relacionar os níveis de expressão dos genes chaves do ciclo do N da comunidade desnitrificante do solo com as emissões de N_2O .

2 ARTIGO: RELAÇÃO ENTRE AS EMISSÕES DE N₂O E A EXPRESSÃO DOS GENES DO CICLO DO NITROGÊNIO EM UM SOLO CULTIVADO COM MILHO SOBRE RESÍDUO DE ERVILHACA

2.1 RESUMO

A adição de resíduos de leguminosas para cobertura do solo no sistema de plantio direto pode aumentar as emissões de N₂O. Porém, quando há déficit hídrico e cultivo de gramíneas em sucessão, a atividade dos microrganismos desnitrificantes e as emissões podem ser menores. O presente trabalho teve o objetivo de quantificar as emissões de N₂O de um solo cultivado em plantio direto com milho sobre diferentes quantidades de resíduos de ervilhaca, em condições de baixa disponibilidade hídrica, e relacionar com a dinâmica da expressão de genes chaves do ciclo do N da comunidade desnitrificante do solo. Para isto, foi instalado um experimento a campo onde o milho foi cultivado sobre 0, 3, 6 e 9 Mg MS ha⁻¹ de ervilhaca *Vicia villosa* Roth. Durante 161 dias foram quantificadas no solo as emissões de N₂O e CO₂, N mineral, umidade, temperatura do solo, decomposição dos resíduos, além dos teores de C e N nas plantas. O RNAm do solo das datas com maiores emissões de N₂O foi extraído e utilizado para o estudo da expressão relativa dos genes *nirK* e *nosZ*. As emissões acumuladas de N₂O foram semelhantes entre os tratamentos com resíduos (média de 0,645 kg ha⁻¹). As plantas de milho absorveram N (66, 83 e 103 kg ha⁻¹) proporcionalmente à quantidade de resíduo depositada na superfície do solo. Com isto, houve redução da disponibilidade de N mineral no solo, que conjuntamente com a baixa disponibilidade hídrica, resultou em baixas emissões acumuladas de N₂O. A expressão dos genes *nirK* e *nosZ* foram menores quando há maiores emissões de N₂O do solo.

2.2 INTRODUÇÃO

Os solos agrícolas são responsáveis por aproximadamente 36% das emissões de óxido nitroso (N₂O) oriundas do setor agropecuário, conforme levantamento realizado em 2016 (MCTIC, 2020), com tendência de aumento, conforme o Segundo Boletim WMO de Gases de Efeito Estufa (2019). Este cenário vem alertando a comunidade mundial, já que o aumento da concentração deste gás na atmosfera pode resultar na diminuição da camada de ozônio e contribuir para o aquecimento global (CRUTZEN e EHALT, 1977; RAVISHANKARA et al. 2009). O N₂O é emitido do solo para a atmosfera a partir dos processos de nitrificação e

desnitrificação, realizados por ampla variedade de microrganismos, como Bactérias e Archeas nitrificantes e desnitrificantes, e alguns fungos (HAYATSU et al. 2008).

A nitrificação ocorre em condições aeróbicas, emitindo N_2O como subproduto da reação de oxidação da amônia a nitrato (NO_3^-). Na ausência de oxigênio no solo, a ocorrência de desnitrificação é favorecida, onde microrganismos anaeróbicos facultativos utilizam o NO_3^- como aceptores alternativos de elétrons (REGAN et al. 2017), ocasionando aumento da emissão de N_2O . A magnitude destas emissões depende de uma série de fatores do solo, como por exemplo disponibilidade de C e N (ZHU et al. 2021), umidade e O_2 (MOSIER et al. 2002). As práticas agrícolas como adubação, revolvimento, compactação, adição de resíduos de culturas, irrigação, etc, podem alterar estes fatores, que por sua vez alteram a atividade dos microrganismos e conseqüentemente modificam os fluxos do N_2O do solo.

Uma sucessão utilizada com frequência no sistema de plantio direto da região subtropical do Brasil é o cultivo de ervilhaca (*Vicia villosa* Roth ou *V. sativa* L.) no inverno para produção de cobertura morta para o milho cultivado no verão. Inúmeros autores destacaram os benefícios desta sucessão (VELOSO et al. 2019; POTT et al. 2021), porém há aumentos da emissão de N_2O do solo devido a maior disponibilidade de N mineral a comunidade desnitrificante advindo da decomposição dos resíduos da ervilhaca (SCHMATZ et al. 2020). Um fator que pode reduzir as emissões de N_2O nesta região é a frequente falta de chuva durante o verão, por outro lado, o cultivo de milho necessita de disponibilidade hídrica para adequado desenvolvimento. Especificamente na microrregião onde o presente estudo foi desenvolvido, ocorreram chuvas abaixo da normal climatológica em 65% dos anos das últimas duas décadas (INMET, 2022). Em estudo avaliando possíveis cenários de mudanças climáticas para 10 regiões produtoras de milho no Brasil, Souza et al. (2019) verificaram que há uma tendência para aumento da temperatura e diminuição das chuvas em 2050.

Neste cenário, estima-se que as emissões de N_2O do solo sejam reduzidas quando o milho é cultivado sobre resíduos de leguminosas, porém, estas informações são escassas na literatura, assim como não foram completamente elucidados os efeitos das diferentes quantidades de resíduos de ervilhaca sobre as emissões de N_2O do solo durante o cultivo em sucessão com o milho. No estudo Schmatz et al. (2020) foram adicionados 3, 6 e 9 Mg ha^{-1} de resíduos secos de *V. sativa* sobre o solo, obtendo-se emissões cumulativas de N_2O não proporcionais a quantidade de resíduos. Porém, neste estudo as condições climáticas foram diferentes, somente a parte aérea das plantas foi adicionada ao solo e não houve cultivo do milho em sucessão, o que pode ter influenciado os resultados. Em meta-análise com 26 artigos, Basche et al. (2014) verificaram que em 40% dos estudos, os resíduos das plantas de cobertura influenciaram

negativamente as emissões de N_2O , enquanto 60% dos estudos observaram aumentos dos fluxos deste gás, sendo que, alguns fatores podem favorecer o aumento das emissões, como: culturas de cobertura leguminosas, quantidade e incorporação do resíduo, temperatura do solo, disponibilidade de N e C orgânico etc.

Apesar de diversos estudos terem sido desenvolvidos para entender as interações biológicas, ambientais e de manejo responsáveis pelas emissões de N_2O dos solos (BAYER et al. 2015; PINHEIRO et al. 2019; SCHMATZ et al. 2020), muitas lacunas ainda persistem. Uma alternativa para estes estudos é a utilização de técnicas moleculares capazes de quantificar a expressão de genes funcionais chaves que codificam as enzimas envolvidas nos processos de nitrificação e desnitrificação (BUTTERBACH BAHLE et al. 2013). Isto pode ser especialmente útil no entendimento dos fluxos de N_2O em resposta ao comportamento da comunidade microbiana relacionada ao ciclo do N (ANGNES et al. 2013). Muitos trabalhos que analisaram o DNA microbiano do solo em diferentes condições experimentais divergiram ao estabelecer uma relação entre as emissões de N_2O e a abundância de nitrificantes (TOSI et al. 2020) e desnitrificantes (MILLER et al. 2008; TOSI et al. 2020), sugerindo que o estudo do mRNA possa ser uma alternativa mais adequada para este entendimento (BOWEN et al. 2018).

Ao nosso conhecimento, não há relatos na literatura sobre a quantificação da expressão dos genes chave do ciclo do N e as emissões de N_2O em solos cultivados com milho sobre os resíduos da ervilhaca, onde o milho torna-se um competidor por N mineral e água, e diminui o fornecimento destes para os processos microbiológicos emissores de N_2O . Para contribuir com este conhecimento, foi conduzido um estudo a campo com o objetivo de quantificar as emissões de N_2O de um solo cultivado em plantio direto com milho sobre diferentes quantidades de resíduos de ervilhaca, em condições e déficit hídrico e relacionar com a dinâmica da expressão de genes chaves do ciclo do N e da comunidade desnitrificante do solo. Nossas hipóteses foram: 1) a emissão de N_2O aumenta com o aumento da quantidade de resíduo de ervilhaca depositada sobre o solo; 2) a absorção do N mineral pelas plantas de milho reduz a sua disponibilidade no solo e por consequência as emissões de N_2O ; 3) há diferentes níveis de expressão dos genes chaves do ciclo do N nos diferentes níveis de emissões de N_2O .

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Local e solo

O estudo foi conduzido na área experimental do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil (29°42'44" S, 53°42'74" W, 90 m). O solo é classificado como Argissolo Vermelho Distrófico arênico (EMBRAPA, 2013) e Hapludult (SOIL SURVEY STAFF, 2014). O clima da região é subtropical úmido, tipo Cfa, segundo a classificação de Köppen. As avaliações deste estudo foram durante o cultivo do milho no verão de 2020/2021. O histórico de uso da área experimental foi de cultivo de consórcio aveia/azevém (*Avena strigosa* Schreb. / *Lolium multiflorum* Lam.) no inverno de 2019, soja (*Glycine max* (L.) Merr.) no verão de 2019/2020 e ervilhaca peluda (*Vicia villosa* Roth.) no inverno de 2020. No início do experimento, o solo na camada de 0,10 m apresentava as seguintes características: pH (H₂O 1:1) 5,1; matéria orgânica (Walkley-Black) 13,8 g kg⁻¹; fósforo (Mehlich⁻¹) 15,3 mg dm⁻³; potássio (Mehlich⁻¹) 49,0 mgdm⁻³; cálcio (KCl 1M) 2,4 cmol_cdm⁻³; magnésio (KCl 1M) 1,1 cmol_cdm⁻³; CTC (pH 7,0) 11,2 cmol_cdm⁻³; saturação por bases 34,23%; alumínio (KCl 1M) 0,35 cmol_cdm³; saturação por alumínio 9,2%.

2.3.2 Tratamentos e delineamento experimental

No período entre abril e setembro de 2020, durante o outono/inverno, realizou-se o cultivo da ervilhaca peluda com densidade de 60 kg ha⁻¹ de semente, sem o uso de adubação, para produção de biomassa vegetal para o cultivo do milho (*Zea mays* L.) no verão de 2020/2021. O delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso (DBC), com quatro tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos referem-se às quantidades de resíduos de ervilhaca presentes na superfície do solo (solo descoberto, 3, 6 e 9 Mg de massa seca ha⁻¹). No período de floração plena (FP) da ervilhaca foram realizadas quantificações da massa seca, que em média foram de 3 Mg de MS ha⁻¹, sem qualquer tipo de fertilização. No dia 0 (considerado o início do experimento), a ervilhaca foi morta com herbicida glifosato na dose recomendada e foram demarcadas 16 unidades experimentais de 13,125 m² (3,50m x 3,75m), com área útil para amostragens de solo de 7,675 m² (2,50m x 3,07 m). Neste estágio, foi determinada a composição da parte aérea da ervilhaca (em g kg⁻¹) pelo método de Van Soest conforme descrito por Redin et al. (2014): C = 429.4; N = 30.8; fração solúvel (FS) = 489.1; celulose (CEL) = 287.7; lignina (Lig) = 93.27; C:N = 13.94. Após determinar a quantidade de massa seca

produzida em cada parcela, a partir da coleta da parte aérea por um quadrado de área conhecida e posterior secagem até peso constante, as quantidades de resíduo de cada tratamento foram ajustadas mediante a retirada de biomassa de áreas adjacentes. Após 6 dias foi semeado o milho (cultivar Brevant, B2433PWU). O espaçamento foi de 0,5 m entre linhas e 0,34 m entre plantas (densidade de 60.000 plantas ha⁻¹) e a adubação com fósforo e potássio foi realizada de acordo com as recomendações técnicas.

2.3.3 Decomposição e liberação de C e N pela ervilhaca

A taxa de decomposição da ervilhaca no campo foi avaliada pelo método de caixa de decomposição (29 cm de largura, 29 cm de comprimento, 8 cm de altura), com tela com malha na parte superior da caixa de 0,10 m de abertura e na parte inferior de 0,05 m de abertura (DIETRICH et al. 2019). As caixas contendo as quantidades equivalentes a 3, 6 e 9 Mg ha⁻¹ de massa seca de ervilhaca foram distribuídas nas parcelas com as mesmas quantidades de biomassa. Não foram utilizadas caixas nas parcelas com solo descoberto. Para avaliar a taxa de decomposição foram realizadas sete amostragens aos 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 161 dias após instalação do experimento (DAI). Paralelamente a isso, foram utilizadas caixas com resíduos para controle da espessura da palhada a partir das medições não destrutivas. Após cada coleta, as amostras foram pesadas, secas a 65°C até peso constante, limpas e pesadas novamente para descontar o valor do solo retirado durante a limpeza. Posteriormente, os resíduos foram moídos em moinho tipo Willey (~1mm) e após em moinho de bolas. Por fim, estas amostras foram colocadas em mufla por três horas a 550°C para determinação das cinzas e/ou utilizadas para determinação dos teores de N e C, quantificados em analisador elementar (FlashEA 1112, Thermo Finnigan, Milão, Italia).

2.3.4 Emissões de N₂O e CO₂

As emissões de N₂O e CO₂ foram realizadas a partir da utilização de câmaras isoladas (sem ventilação e sem fluxo estacionário) (ROCHETTE E BERTRAND, 2008) e posteriormente analisadas em cromatógrafo a gás (GC-2014, Shimadzu, Japão). As amostragens iniciavam após a inserção da câmara em uma base de metal inserida a 0,05 m no solo. As amostras de gás foram coletadas em seringas de polipropileno de 20 mL e foram realizadas antes e após precipitações pluviométricas e preferencialmente entre 09 e 12 horas, quando as concentrações de N₂O são consideradas representativas das emissões médias diárias

(REEVES et al., 2016). Posteriormente, o gás foi transferido e armazenado para frascos de vidro pré-evacuados (Labco, Lampeter, Reino Unido). Em cada amostragem foram coletadas amostras nos tempos 0, 15 e 30 minutos após instalação da câmara no suporte. Nos primeiros 60 dias, foram realizadas de duas a três coletas de gases por semana, posteriormente as coletas foram espaçadas.

2.3.5 Fatores ambientes do solo e dados meteorológicos

A temperatura do solo foi monitorada a partir da utilização de sensores tipo T, acoplados a um data logger (CR1000; Campbell Scientific, Logan, USA), instalados a 0,025 m e 0,075 m de profundidade, com três repetições para cada tratamento e leituras a cada 10 minutos. Os dados de temperatura foram calculados para os mesmos dias em que foram registrados os dados de umidade, totalizando 21 eventos. A umidade gravimétrica do solo foi determinada após 72 horas a 105°C e nas profundidades de 0-0,05m e 0,05-0,10m, coincidindo com as coletas de gases. Nas amostras com umidade natural foi realizado a extração de N inorgânico do solo (NH_4^+ e NO_3^-) conforme metodologia descrita por Schmatz et al. (2020) utilizando-se colorímetro automático (SAN plus, Skalar, Holanda) e o resultado corrigido para massa seca. Os dados diários de temperatura e umidade do ar foram obtidos a partir de uma estação meteorológica oficial localizada a 1,7 km do experimento.

2.3.6 Determinação do C e N totais do milho e cálculo da produtividade

No estágio de pendramento (VT) e na maturação fisiológica (R6) foram coletadas 4 plantas de milho de cada parcela para determinação do acúmulo total de N e C, incluindo os grãos. As plantas inteiras foram secas a 65°C até peso constante, moídas e analisadas, seguindo metodologia mencionada no item 2.3.3. Os grãos secos foram moídos primeiro em moinho e depois com pistilo e grau. A produtividade de milho foi determinada a partir da colheita das espigas de todas as plantas da área útil da parcela (5,46m²), excluindo-se as duas linhas externas. Os grãos foram secos a 65°C para determinar a produção de cada parcela.

2.3.7 Quantificação da expressão relativas de genes chaves do ciclo do N

O solo (0-0,05 m) foi coletado em cada evento de coleta de gases, congelados ainda no campo em N líquido e transferido para ultrafreezer a -80°C até a extração de RNA. Para

quantificação relativa da expressão gênica selecionou-se as amostras de solo das duas coletas com maiores emissões de N₂O (2 e 28 DAI). O RNA do solo foi extraído usando o kit de isolamento RNeasy® PowerSoil® Total RNA kit (Qiagen, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante, com modificações. A pureza e a quantidade de RNA foram determinadas em espectrofotômetro (Nanodrop1000, Thermo Fisher Scientific, EUA) e por eletroforese, usando um gel de agarose a 2%. Aproximadamente 1000 ng de RNA de cada amostra foi tratado com DNase e convertido para DNA complementar (cDNA), utilizando o kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen, Alemanha), totalizando ao final 50 ng μL^{-1} , os quais foram armazenados em -20°C até análise. Controles tratados com DNase, porém sem a transcrição reversa foram conduzidos e posteriormente submetidos a PCR padrão para verificar a eficácia de eliminação de gDNA. Todas as amostras foram diluídas na concentração de 1:5.

Para quantificar a expressão relativa de genes funcionais que codificam as enzimas chaves do ciclo do N foi utilizada a PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). As amplificações em RT-qPCR (StepOne™ Real Time, Applied Biosystems, Singapore) foram realizadas com os pares de primers (Tabela 1): cd3aF (MICHOTÉY et al. 2000) e R3cd (THROBACK et al. 2004) para o gene *nirS*; nirK876 e nirK1040 para o gene *nirK* (HENRY et al. 2004); cnorB_BF e cnorB_BR (DANDIE et al. 2007) para o gene *norB*; nosZ2F e nosZ2R para estudo do gene *nos* (HENRY et al. 2006). O RT-qPCR foi realizado usando duas réplicas técnicas para cada amostra, duas réplicas biológicas para cada tratamento e dois RT-qPCR independentes foram realizadas com cada par de primer em que foi observada expressão gênica, em cada data avaliada, a fim de avaliar a repetibilidade de resultados. As condições para amplificação de cada par de primer estão disponíveis no material suplementar (Tabela 1S e 2S).

Tabela1 - Primers utilizados para amplificar genes funcionais que codificam enzimas chaves do ciclo do N por RT-qPCR.

Gene	Nome do primer	Amplicon (kb)	Sequência do primer (5'-3')
<i>16S rRNA</i>	341F	177	CCTACGGGAGGCAGCAG
	518R		ATTACCGCGGCTGCTGG
	nirK876	165	ATYGGCGGVAYGGCGA
<i>NirK</i>	nirK1040		GCCTCGATCAGRTRTGGTT
<i>NirS</i>	cd3aF	410	G TSAACG TSAAGGARACSGG
	R3cd		GASTTCGGRTGSGTCTTGA
<i>NorB</i>	cnorB _B F	177	AIGTGGTCGAGAAGTGGCTCTA
	cnorB _B R		TCTGIACGGTGAAGATCACC
<i>NosZ</i>	nosZ2F	267	CGCRACGGCAASAAGGISMSSGT
	nosZ2R		CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA

Com o gene *housekeeping* foi realizada uma curva padrão com 4 diluições (1:5, 1:25, 1:125; 1:625) para o programa utilizado com cada primer, a partir de um pool de cDNA das amostras ambientais, a fim de determinar sua eficiência. A quantificação foi baseada na intensidade fluorescente do corante SYBR Green™ a partir da utilização do QuantiNova™ SYBR Green PCR (Qiagen, Alemanha). A especificidade da reação foi monitorada a partir da análise da curva de melting. As expressões relativas dos genes foram calculadas usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (SCHMITTGEN & LIVAK, 2008) e utilizou-se o gene 16S rRNA, descrito por Muyzer et al. (1993), como normalizador.

2.3.8 Análise dos dados

O EPSA foi calculado a partir do conteúdo volumétrico de água [umidade volumétrica = umidade gravimétrica x Ds x 100] e porosidade total ($Pt = 1 - (Ds/2.65)$], sendo Pt porosidade total e Ds igual a densidade do solo. A temperatura média diária do solo foi determinada com base na média de 144 medições diárias. O C e N totais dos resíduos de decomposição e da parte aérea do milho foram calculados para cada data de coleta com base na concentração de N e C, nas cinzas do resíduo e na massa seca remanescente. Os teores de C e N totais dos grãos de milho foram obtidos a partir da multiplicação entre a concentração de C e N e a produtividade. Os fluxos diários de N₂O e de CO₂ foram calculados de acordo com Rochette e Bertrand (2008), já o acumulado destes gases foi obtido por interpolação linear de fluxos entre as datas de

amostragens consecutivas. O fator de emissão (EF) de N_2O foi calculado a partir da subtração das emissões acumuladas de $N-N_2O$ de cada tratamento com resíduo e das emissões acumuladas de $N-N_2O$ dos tratamentos controle, dividido pela N total adicionado pelas diferentes quantidades de resíduos, multiplicado por 100. O N inorgânico ($NH_4^+ - N + NO_3^- - N$, em $kg N ha^{-1}$) das camadas de 0-0,05m e 0,05-0,10m de profundidade do solo foi calculado pela multiplicação entre a concentração de N inorgânico ($mg N kg^{-1}$ solo seco) e a massa seca do solo, determinada pela densidade do solo. A produtividade do milho foi calculada a partir da massa seca dos grãos e corrigida para 13% de umidade. A eficiência agronômica do uso do N (EAN) foi obtida pela divisão entre a produtividade do milho e a quantidade de N adicionado. A recuperação aparente do N (RAN) foi obtida pela divisão entre o N acumulado nos grãos + teor de N na parte aérea.

Foram testadas as normalidades dos dados e a significância pela análise de variância ($P < 0,05$). As diferenças foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas no ambiente estatístico R, versão 4.0.3 (R Core Team, 2016) e a diferença mínima significativa entre tratamentos (DMS) foi calculada pelo software SISVAR[®] (versão 5.6) (FERREIRA, 2014). Os gráficos foram construídos com as médias de cada variável em cada tratamento pelo programa SigmaPlot (versão 11.0) (Systat Software Inc[®]). Nos gráficos, as barras verticais indicam o DMS apenas das datas em que foram observadas diferenças estatísticas. Para os fluxos acumulados de N_2O e CO_2 não foi adicionado DMS, mesmo nas datas diferentes estatisticamente.

2.4 RESULTADOS

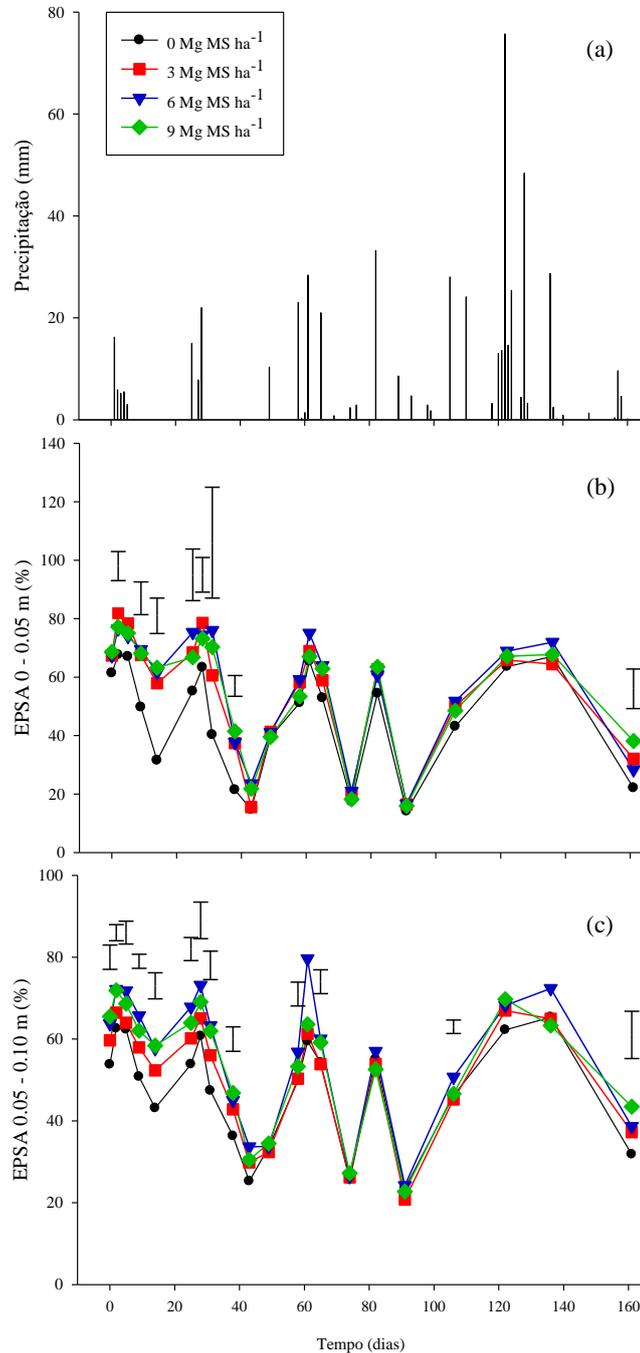
2.4.1 Condições ambientais

Durante os 161 dias de experimento (6 dias de pré-semeadura + 155 dias de cultivo de milho) a precipitação pluviométrica total foi de 541,2 mm, 36% abaixo da normal climatológica (1981 – 2010) (Figura 1a). Além disto, a distribuição das chuvas foi desuniforme (Figura 1a). Nos primeiros 60 dias após instalação (DAI) do experimento ocorreram somente 135,3 mm de precipitação (25% do total). Os períodos mais críticos de baixa disponibilidade hídrica coincidiram com a germinação e emergência do milho, entre 6-24 e 29-48 DAI, respectivamente. A temperatura do ar apresentou valores muito próximos à normal climatológica, com médias de 21°C na primavera (29.09.20 a 21.12.20) e de 24°C no verão (21.12.20 a 09.03.21). A menor temperatura do solo foi de 16°C, observado aos 5 DAI e a

máxima foi de 29°C aos 91 DAI. Os tratamentos com resíduos não apresentaram diferenças nas temperaturas médias do solo na maioria das datas, porém diferiram do tratamento com solo descoberto. Este foi, em média, 1,17°C e 1,02°C mais quentes, nas camadas de 0-0,5 m e 0,05-0,10 m, respectivamente.

A densidade do solo, necessária ao cálculo do EPSA (espaço poroso saturado por água), apresentou média de 1,55 g cm⁻³ na camada de 0-0,05 m e de 1,66 g cm⁻³ na camada de 0,05-0,10 m, teve uniformidade em toda a área e não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos. Em consequência da baixa precipitação pluviométrica, o EPSA nunca atingiu 100% durante o experimento, apresentando picos superiores de 81% e inferiores de 14% na camada de 0-0,05m (valor médio de 53,43%) e de 79% e 20% na camada de 0,05-0,10m (valor médio de 52,22%) (Figura 1b e 1c). Na camada superior e até os 28 DAI, o EPSA foi menor no tratamento com solo descoberto e não houve diferenças entre os tratamentos com resíduos (Figura 1b). No período de 38 – 136 DAI, não houve diferenças, entre todos os tratamentos nesta camada, devido a maior ocorrência de chuvas. O EPSA da camada de 0,05 - 0,10 m foi superior, em relação a camada superficial, aos 38, 43, 74, 91, 122 e 161 DAI (Figura 1c).

Figura 1 - Precipitações pluviométricas diárias (a) e valores de EPSA para as camadas de 0-0,05 m (b) e 0,05-0,10 m (c) observadas ao longo de 161 dias de experimento onde o milho foi cultivado sob 0, 3, 6 e 9 Mg ha⁻¹ de resíduo de ervilhaca. As barras verticais indicam a diferença mínima significativa entre tratamentos (Tukey P<0,05).



2.4.2 Decomposição dos resíduos da ervilhaca

Durante o cultivo do milho, os valores de MS, C e N totais dos resíduos de ervilhaca depositados sobre o solo decresceram exponencialmente (dados não apresentados). A maior redução ocorreu nos primeiros 15 dias e aproximadamente 50% da MS, C e N totais do resíduo

foi decomposto até os 60, 45 e 60 DAI, respectivamente. Menores taxas de decomposição, foram observadas entre os 90 e 120 DAI. As porcentagens de massa seca remanescentes dos resíduos não diferiram estatisticamente entre os tratamentos em nenhuma das coletas. A porcentagem de C total remanescente no tecido apresentou diferença somente aos 90 DAI, quando o tratamento com 3 Mg ha⁻¹ apresentou 33,84% e foi significativamente diferente dos demais tratamentos, que apresentaram valor médio de 40,31%. A porcentagem de N remanescente nos tecidos da ervilhaca aos 60 DAI, foi significativamente menor no tratamento com 3 Mg ha⁻¹ (31%) em relação aos demais tratamentos que apresentaram médias estatisticamente iguais (37 e 41%, para 6 e 9 Mg ha⁻¹, respectivamente). Ao final do experimento (161 DAI), a porcentagem de N remanescente foi de 17,76, 26,15 e 26,94% do inicial, para 3, 6 e 9 Mg ha⁻¹, respectivamente. O resíduo depositado na superfície do solo apresentou espessura de acordo com a quantidade adicionada e mostrou diferenças estatísticas em todas as 8 datas de medição (dados não apresentados). A espessura inicial foi de 3,15, 5,35 e 6,51 cm nas parcelas com 3, 6 e 9 Mg ha⁻¹, respectivamente. No final do experimento, os valores observados foram de 0,69, 1,05 e 1,54 cm para 3, 6 e 9 Mg ha⁻¹, respectivamente, o que representou um decréscimo de 80% desde o início do experimento.

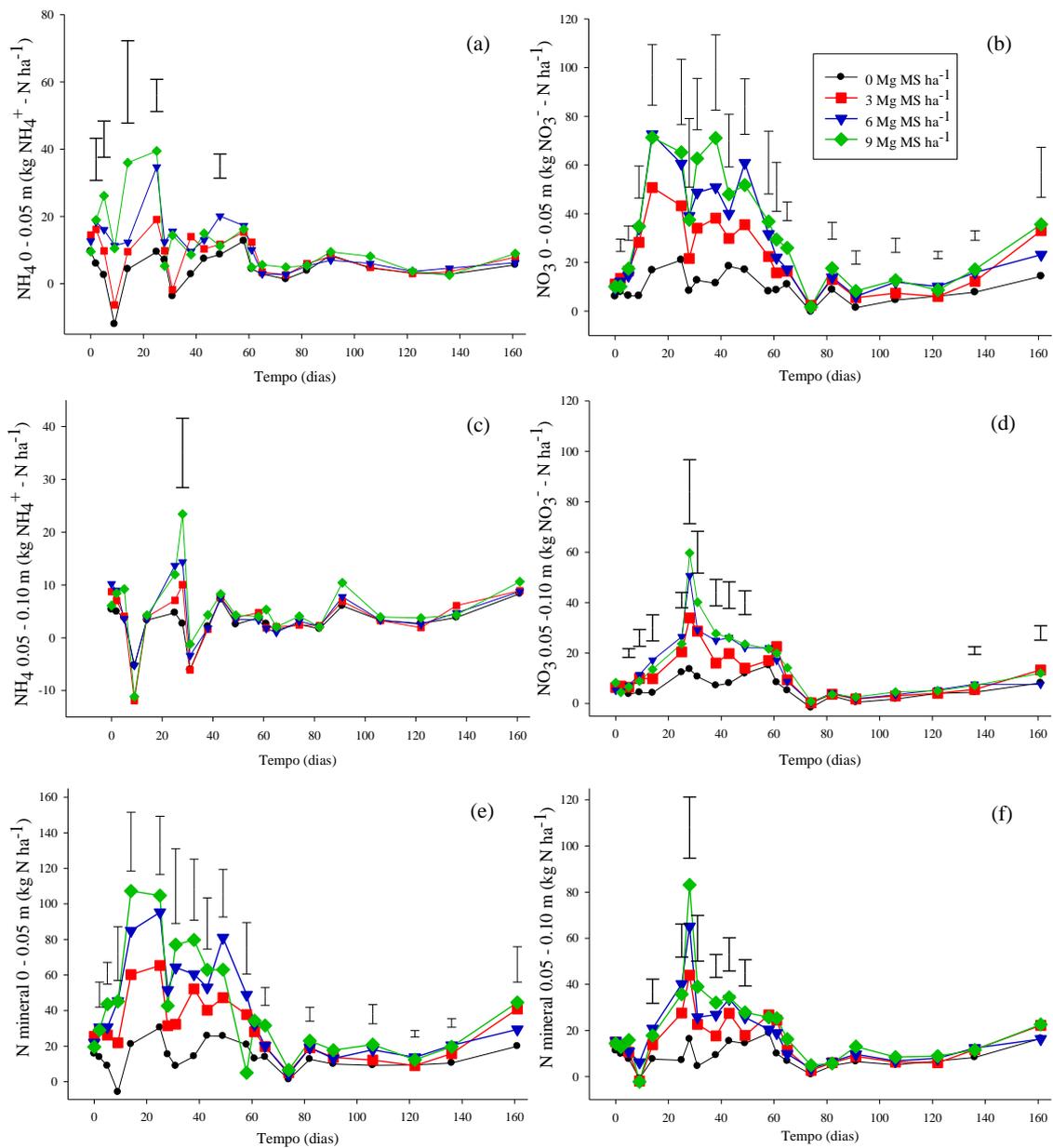
2.4.3 Dinâmica do N mineral no solo

A disponibilidade de N mineral na camada de 0 – 0,05 m foi maior até os 58 DAI do início do experimento (Figura 2e). Após esta data e até o final do experimento, a disponibilidade foi menor e não diferiu estatisticamente entre os tratamentos. Como esperado, a disponibilidade no solo descoberto foi inferior aos tratamentos com ervilhaca. Para NH₄⁺, houve diferença estatística entre os tratamentos com 9 Mg ha⁻¹ e o solo descoberto aos 2, 5, 14 e 25 DAI e não mais após esta data. O NO₃⁻ apresentou diferenças em todas as datas de coleta exceto no 74 DAI (Figura 2b), sendo maior quanto maior a quantidade de resíduo de ervilhaca adicionada ao solo. Os tratamentos com 6 e 9 Mg ha⁻¹ não diferiram entre si na maioria das coletas, sendo estatisticamente superiores aos demais.

Os picos nos teores de NH₄⁺ (Figura 2c) e NO₃⁻ (Figura 2d) na camada de 0,05-0,10 m ocorreram somente aos 28 DAI, sendo maiores nas maiores quantidades de resíduo de ervilhaca (Figura 2). Após o 28 DAI para o NH₄⁺ e 58 DAI para o NO₃⁻ (exceto 136 e 161 DAI) as disponibilidades nesta camada foram baixas e não diferiram entre os tratamentos até o final do experimento. As diferenças estatísticas nos teores de NH₄⁺ foram observados somente aos 28

DAI, quando 9 Mg ha^{-1} diferiu estatisticamente de 0 e 3 Mg ha^{-1} . Para o NO_3^- os tratamentos com 6 e 9 Mg ha^{-1} apresentaram maiores teores que o solo descoberto aos 28 e 31 DAI.

Figura 2 - Dinâmica do $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (a, c), $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (b, d) e N mineral (e, f) no solo nas camadas de 0 – 0,05 m (a, c, e) e 0,05 – 0,10 m (b, d, f) em 21 dias de coleta ao longo de 161 dias de experimento onde o milho foi cultivado sobre 0, 3, 6 e 9 Mg ha^{-1} de resíduo de ervilhaca em condições de baixa disponibilidade hídrica. As barras verticais indicam a diferença mínima significativa entre tratamentos (Tukey $P < 0.05$).

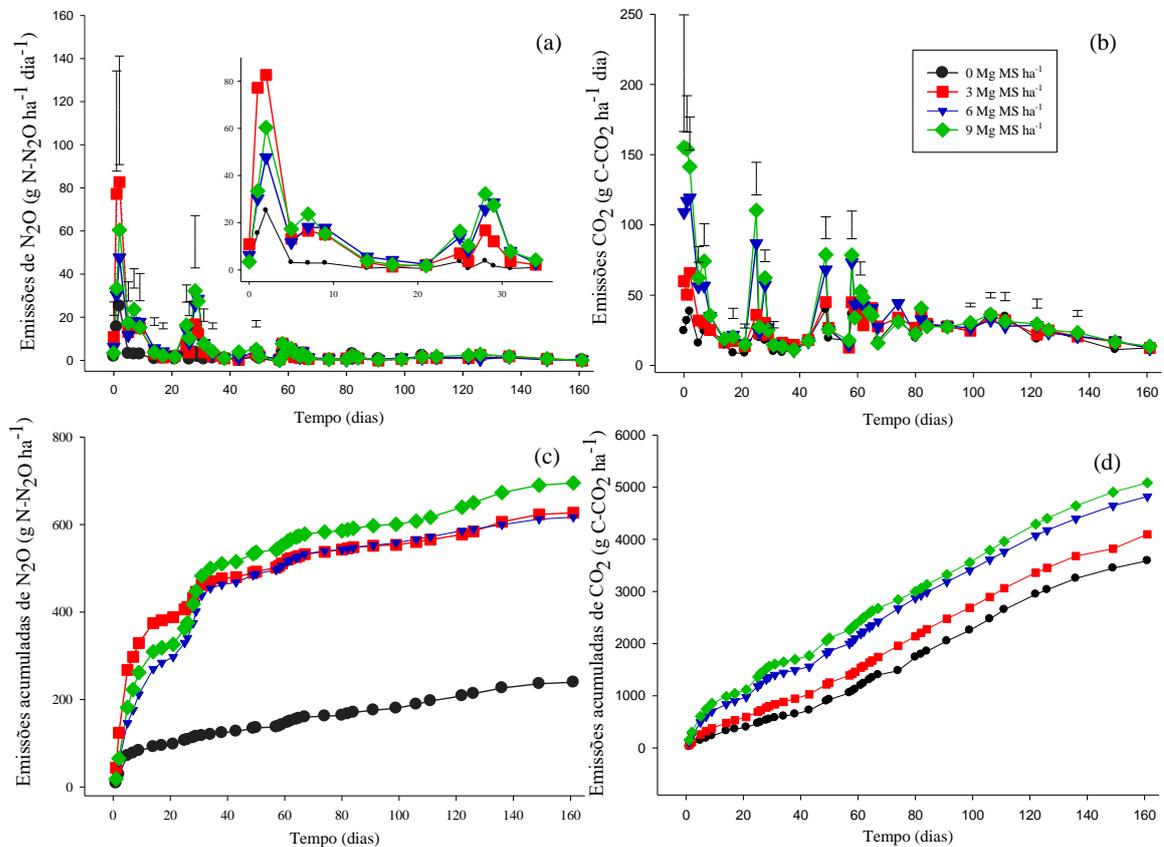


2.4.4 Emissões de N₂O e CO₂

O maior fluxo diário de N₂O do experimento ocorreu aos 2 DAI do experimento, 4 dias antes da semeadura do milho (Figura 3a). Nesta data, a maior emissão ocorreu no tratamento com 3 Mg ha⁻¹ (82,70 ± 32,09 g ha⁻¹ dia⁻¹), não diferindo estatisticamente dos demais tratamentos com resíduos e diferindo de solo descoberto. Outros picos foram observados nas coletas aos 5 e 7 DAI, quando o tratamento 9 Mg ha⁻¹ apresentou as maiores emissões, mas diferindo estatisticamente apenas do solo descoberto. Os próximos picos de emissões ocorreram entre 25 e 28 DAI. Estes picos foram maiores quanto maiores as quantidades de resíduos sobre o solo e foram coincidentes com eventos pluviométricos. Após esta data, as emissões foram menores e não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos. Os fluxos acumulados de N₂O ao final do experimento foram maiores nos tratamentos com resíduo de ervilhaca, sem diferenças estatísticas entre eles (em média 0.645 kg ha⁻¹). Mas as emissões destes três tratamentos diferiram do solo descoberto a partir dos 14 DAI (Figura 3c). Ao final do experimento, o tratamento com 3 Mg ha⁻¹ apresentou 1,60% maior acúmulo de N₂O que o tratamento com 6 Mg ha⁻¹.

Os maiores fluxos diários de CO₂ ocorreram aos 0 DAI, imediatamente após a morte da ervilhaca com herbicida e ajuste da quantidade de massa seca em cada parcela (Figura 3b). As datas em que foram registrados picos, os fluxos diários foram maiores quanto maiores as quantidades de resíduo sobre o solo. As emissões de CO₂ permaneceram altas até o 7 DAI. Outros picos ocorreram aos 49, 58 e 61 DAI, com diferenças estatísticas entre as duas maiores quantidades de resíduos em relação as duas menores, sendo estes coincidentes com períodos de precipitação. No final do experimento, os fluxos acumulados de CO₂ foram estatisticamente iguais em 6 e 9 Mg ha⁻¹, diferentes de 3 Mg ha⁻¹ e este diferente de solo descoberto.

Figura 3 – Fluxos de N-N₂O (a) e C-CO₂ (b) e quantidades acumuladas de N₂O (c) e CO₂ (d) durante 161 dias de experimento em que o milho foi cultivado sobre 0, 3, 6 ou 9 Mg ha⁻¹ de resíduo de ervilhaca em condições de baixa disponibilidade hídrica. As barras verticais indicam a diferença mínima significativa entre tratamentos (Tukey P<0,05).

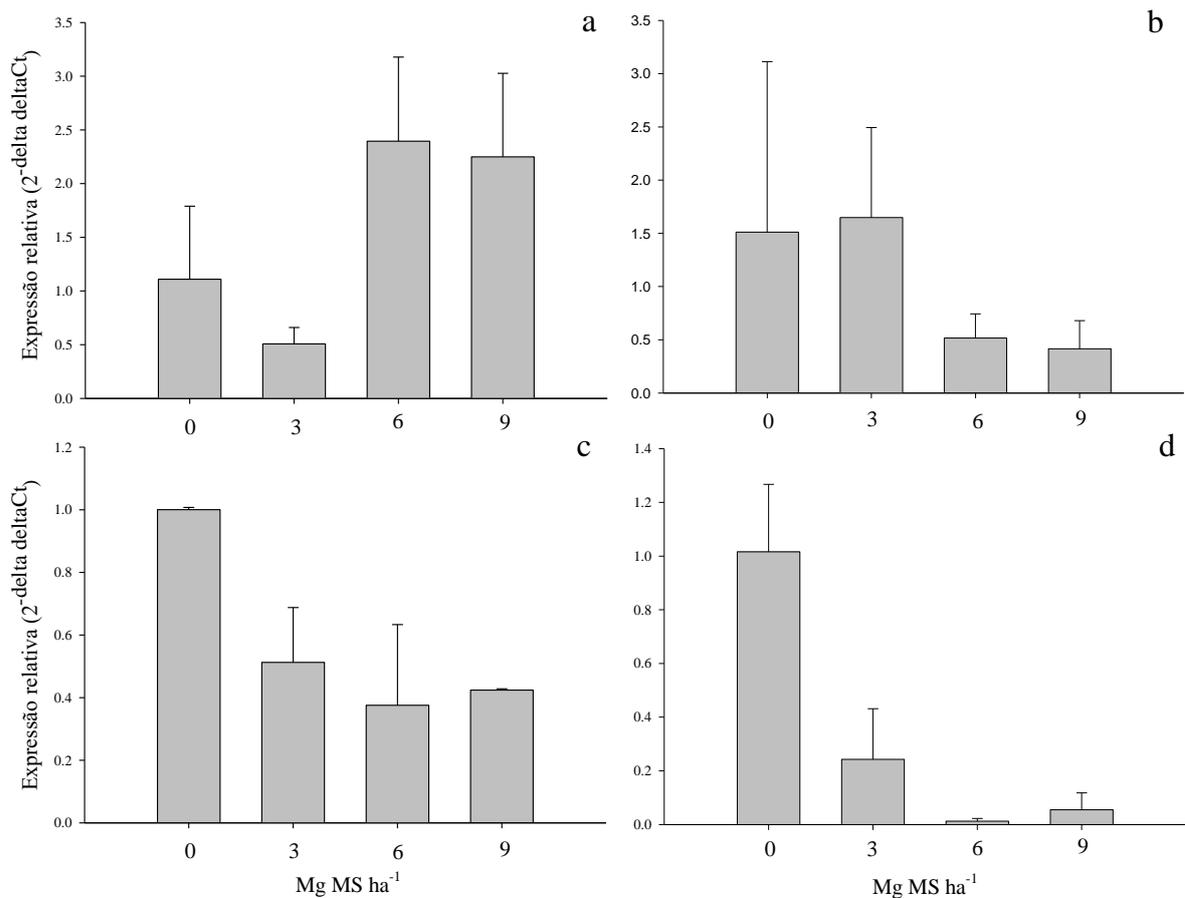


2.4.5 Expressão dos genes

A qualidade do RNA extraído foi verificada em gel de agarose (2%) e em espectrofotômetro nanodrop. As amostras selecionadas para reação com a transcrição reversa apresentaram razão A260/A280 que variaram de 1,56 até 1,95. Em média, foi extraído 223 ng μL^{-1} de RNA por amostra. Foram avaliadas as expressões dos genes *nirS*, *nirK*, *norB* e *nosZ*, porém as expressões relativas do gene *nirS* apresentaram variações entre duplicatas e inespecificidade da curva de *melting*, por isso foi retirado da análise. O gene *norB* não apresentou expressão detectável para as condições deste experimento. A eficiência da curva para o *16S rRNA* foi de 95% com os programas do gene *nirK* e *nosZ*, assim, utilizamos a eficiência de amplificação de 100% para os cálculos. A expressão relativa do gene *nirK*, que codifica a enzima nitrito redutase, foi maior nos tratamentos que apresentaram as menores emissões de N₂O (Figura 4). Este comportamento foi observado aos 2 DAI nos tratamentos 6 e

9 Mg ha⁻¹ e aos 28 DAI no tratamento 3 Mg ha⁻¹. Aos 2 DAI, a expressão relativa média do gene *nirK* foi aproximadamente 9 vezes maior nos tratamentos 6 e 9 Mg ha⁻¹ em relação ao tratamento 3 Mg ha⁻¹. Neste tratamento, aos 28 DAI a expressão do gene *nirK* foi em média 3.5 vezes maior em comparação a 6 e 9 Mg ha⁻¹. A expressão do gene *nosZ*, que codifica a enzima óxido nítrico redutase, foi maior no tratamento sem adição de resíduos nas duas datas e nas maiores emissões de N₂O ocorreram menores expressões deste gene (Figura 4). Aos 2 DAI a expressão deste gene foi muito baixa nos tratamentos com maiores quantidades de resíduos e maiores emissões de N₂O (6 e 9 Mg ha⁻¹).

Figura 4 - Expressão gênica relativa dos genes desnitrificantes *nirK* (a e b) e *nosZ* (c e d) nas datas de 2 (a e c) e 28 (b e d) dias após o início do experimento, onde ocorreram as maiores emissões de N₂O do solo de um experimento onde o milho foi cultivado sobre 0, 3, 6 ou 9 Mg ha⁻¹ de resíduo de ervilhaca em condições de baixa disponibilidade hídrica. As barras de erros verticais indicam o desvio padrão entre amostras.



2.4.6 Teores de N nas plantas e emitido na forma de N₂O

A quantidade de N adicionado ao solo aumentou de acordo com a quantidade de resíduos da ervilhaca, o que conseqüentemente resultou em absorções crescentes de N pelas plantas de milho (Tabela 2). Os teores de C na parte aérea do milho também foram maiores, quanto maior a quantidade de resíduo adicionado (Tabela 3S). Por outro lado, as quantidades de N₂O emitidas foram muito semelhantes entre tratamentos com resíduo de ervilhaca, com média de 0.645 kg ha⁻¹, porém 2,7 vezes superior às observadas no solo descoberto. A porcentagem de N emitido como N₂O foi inversamente proporcional a quantidade de N adicionada ao solo pelos tratamentos, sem haver diferenças entre 6 e 9 Mg ha⁻¹. A eficiência agrônômica do uso do N (EAN) e a recuperação aparente do N (RAN) não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos com resíduo de ervilhaca, apresentando valores médios de 10,44 kg grão kg⁻¹ N ha⁻¹ e 23,02%, respectivamente (dados não apresentados).

Tabela 2 - Teores de N adicionados ao solo, emitidos como N₂O, acumulados como N nos tecidos e produtividade do milho cultivado sobre diferentes quantidades de resíduo de ervilhaca em condições de baixa disponibilidade hídrica.

Resíduo (Mg MS ha ⁻¹)	Nitrogênio (kg ha ⁻¹)						Produtividade do milho (Mg ha ⁻¹)
	Adicionado ao solo pelo resíduo	Parte aérea (florescimento)	Parte aérea (maturação)	Grãos + Parte aérea (maturação)	Emitido como N- N ₂ O	% do N emitido como N ₂ O ¹	
0	0	29.22±6.94c	10.49±2.14b	43.98±3.87c	0.239±0.08b		3.30±0.68b
3	82.4	50.57±9.89b	15.73±4.58b	66.03±15.14bc	0.626±0.17a	0.47±0.26a	4.58±0.61ab
6	185.08	70.53±5.45ab	19.63±1.85b	83.17±8.24ab	0.616±0.12a	0.20±0.08b	5.20±0.55 ^a
9	277.61	84.95±14.29a	34.65±9.03a	102.62±20.61a	0.695±0.10a	0.16±0.05b	4.81±0.79ab
CV		15.76	26.14	18.88	18.44	43.03	16.71

¹ Fator de emissão

2.5 DISCUSSÃO

O presente estudo buscou contribuir com o entendimento da dinâmica das emissões de N₂O de um solo agrícola em um cenário de baixa disponibilidade hídrica, onde a ocorrência de estiagens tem sido cada vez mais frequentes na região subtropical do Brasil. Apesar da sucessão ervilhaca/milho ser utilizada há muitos anos pelos produtores rurais, as emissões de N₂O em

resposta a diferentes quantidades de biomassa depositadas sobre o solo em plantio direto ainda não haviam sido estudadas durante o cultivo do milho. Aproveitou-se este contexto para estabelecer um experimento que buscasse gerar informações qualificadas sobre estas lacunas. Estudou-se o mRNA do solo assim como monitorou-se a maior quantidade possível de fatores ambientais em um experimento a campo. Com este conjunto de dados foi possível relacionar a expressão de genes envolvidos na desnitrificação, com as emissões de N₂O e os fatores ambientais presentes neste agroecossistema. Os resultados obtidos são muito representativos das condições presentes nas propriedades rurais e poderão ser utilizados na tomada de decisões por técnicos e produtores rurais, especialmente em condições de baixa disponibilidade hídrica, situação que foi novamente observada na safra 2021/2022 (CERA, 2021).

Já que intencionalmente não houve qualquer fornecimento de água por irrigação, a umidade do solo do experimento foi dependente da precipitação pluviométrica, a qual foi de 541,2 mm durante os 161 dias do experimento (36% abaixo da média climatológica para o mesmo período). A umidade do solo foi monitorada durante todo o experimento pelos valores de EPSA, que puderam ser comparados entre tratamentos devido à similaridade entre os valores de densidade do solo (FARQUHARSON e BALDOCK, 2007). Espera-se que a deposição de maior quantidade de resíduos na superfície resulte em maior umidade do solo. Porém, aos 0 e 2 DAI o maior EPSA foi observado no tratamento com 3 Mg ha⁻¹ (camada de 0 – 0,05m). Isto decorre da baixa precipitação (16.2mm) do dia anterior e da barreira física à penetração da umidade no solo causada pelas maiores quantidades de resíduo na superfície do solo dos tratamentos com 6 e 9 Mg ha⁻¹. Por outro lado, após 43 DAI, não foram mais observadas diferenças de EPSA entre os tratamentos na camada de 0 – 0,05m, pois ocorreram maiores precipitações pluviométricas e a camada de resíduo sobre o solo estava reduzida, o que permitia que maior volume de água atingisse o solo. Dietrich et al. (2019), em experimento utilizando 4 níveis de resíduos de cana de açúcar sobre o solo (0, 4, 8 e 12 Mg MS ha⁻¹) e 2 níveis de adubação nitrogenada (0 e 100 kg de N), relatam que a camada de resíduo pode interferir na umidade do solo, já que a cobertura vegetal pode absorver umidade. Porém, mesmo com o menor volume de água atingindo a superfície do solo nas maiores quantidades de resíduo, os autores verificaram maior evaporação e menor umidade no solo descoberto.

Assim como em nosso estudo, Singh et al. (2020) ao avaliar as emissões de N₂O em condições de campo da ervilha forrageira (*Lathyrus sphaericus* Retz.) e aveia (*Avena sativa* L.) em maturação precoce ou tardia e incorporadas ao solo, observaram que as dinâmicas entre umidade e emissão de N₂O foram semelhantes, e destacaram a importância deste fator para a ocorrência dos processos de desnitrificação. Mesmo em condições de baixa disponibilidade

hídrica, em 7 e 5 datas (de um total de 21 coletas ao longo de 161 dias) nas camadas de 0 – 0,05 e 0,05 – 0,10 m, respectivamente, o solo do experimento apresentou EPSA maior que 60% em todos os tratamentos, o que em parte pode ser consequência da alta densidade do solo presente no experimento. Linn e Doran (1984) consideram que esta porcentagem já caracteriza ambientes com condições para a desnitrificação. Pimentel et al. (2015) em estudo com condições controladas, atribuíram as emissões de N_2O de solos com EPSA de 70% principalmente ao processo de desnitrificação, mesmo que a nitrificação e a outros processos que emitem N_2O possam ocorrer conjuntamente e ser de difícil diferenciação.

A elevada disponibilidade de N mineral no solo no início do experimento é consequência da baixa relação C:N e baixos teores de lignina, hemicelulose e celulose dos resíduos culturais da ervilhaca. A composição química dos resíduos culturais também é influenciada pelo nível de maturação da cultura, o que resulta em diferentes dinâmicas de decomposição (SINGH et al. 2020). No presente estudos a ervilhaca foi morta no florescimento o que resultou em rápida decomposição nos primeiros 15 DAI, com decréscimo de aproximadamente 25% do total da massa seca sobre o solo, mesmo com baixa disponibilidade de água para os organismos do solo. A rápida liberação de N e C do resíduo ocorre principalmente devido a lixiviação de compostos solúveis (DIETRICH et al. 2019) e a sua baixa relação C/N (PIMENTEL et al. 2015). No presente trabalho, as taxas de decomposição foram semelhantes entre os tratamentos, mesmo que a quantidade de resíduo depositado sobre o solo fosse diferente. Os maiores teores de NO_3^- e NH_4^+ na camada de 0 – 0,05 m foram observadas nas coletas aos 14 e 25 DAI. Ademais, este era um período em que as plantas de milho encontravam-se em estágio inicial de desenvolvimento e sua demanda de N era baixa, o que resultou em acúmulo deste nutriente no solo. Na camada de 0,05 – 0,10 m os maiores teores de NH_4^+ e NO_3^- foram quantificados aos 28 DAI por consequência das precipitações aos 25 e 28 DAI. Desta forma, para um melhor aproveitamento do N proveniente da decomposição dos resíduos culturais de leguminosas deve-se semear o milho imediatamente após a morte da planta de cobertura pelo herbicida (AITA et al. 2004).

Os resíduos das plantas de cobertura no sistema de plantio direto são utilizados para proteção física e melhoria química e biológica do solo. No entanto, quando os resíduos são de leguminosas, pode ocorrer aumento da emissão de N_2O devido a mineralização do N do resíduo e consequente aumento dos teores de NH_4^+ e NO_3^- no solo, fundamentais para os processos de nitrificação e desnitrificação (BROZYNA et al. 2013; BAYER et al. 2015; BAYER et al. 2016). Aliado a isso, os tecidos das leguminosas, antes da sua maturação apresentam elevada concentração de C solúvel prontamente disponível para os microrganismos. Por isto, no

presente trabalho os picos de emissões de N_2O ocorreram aos 1, 2, 7, 25 e 28 DAI e tiveram grande influência no acúmulo total do N_2O do experimento. Os principais fatores ambientais que governaram a emissão do N_2O foram a maior disponibilidade de N mineral no solo e o EPSA maior que 60%, além da elevada disponibilidade de C prontamente disponível. Aos 2 DAI, o valor de EPSA próximo a 80% no tratamento com 3 Mg ha^{-1} determinou a ocorrência do maior pico observado em todo o experimento. Pimentel et al. (2015), em estudo de laboratório, obtiveram emissão cumulativa de N_2O 110 vezes maiores em solo com EPSA de 70% do que em solos com EPSA de 40%. Porém, no presente estudo a ocorrência de poucas precipitações pluviométricas, principalmente durante o período inicial do cultivo do milho, determinaram que o EPSA fosse, em média, de 53% para a camada 0 – 0,05 m e 55% para a camada inferior nos primeiros 65 DAI, quando a disponibilidade de N mineral do solo foi maior. Por isto, os fluxos quantificados no presente trabalho foram menores do que os observados por Schmatz et al. (2020) em outro estudo conduzido em condições de solo e resíduos similares, porém em um ano com precipitação pluviométrica próxima à normal climatológica.

Também aos 2 DAI foi observado que os tratamentos com 6 e 9 Mg ha^{-1} apresentavam EPSA menores (76 e 77%, respectivamente) do que no tratamento 3 Mg ha^{-1} (82%) na camada de 0 – 0,05 m. Isto resultou em menores fluxos de N_2O nos tratamentos com maior quantidade de resíduos depositados sobre o solo, o que pode ser explicado pelo menor volume de água que atingiu o solo nos tratamentos com maior quantidade de resíduos, devido a baixa precipitação pluviométrica registrada nos dias anteriores (16,2mm). A camada de resíduos nestes tratamentos atuaram como uma barreira ao movimento da água em direção ao solo, já que a espessura dos resíduos aos 3 DAI foi 31 e 42% menor no 3 Mg ha^{-1} em comparação a 6 e 9 Mg ha^{-1} , respectivamente.

Outros autores também observaram aumentos nos fluxos diários de N_2O quando ocorre no solo maiores disponibilidades de N mineral, C orgânico dissolvido (GOMES et al. 2009; BAYER et al. 2015) e valores de EPSA maiores que 70% (GOMES et al. 2009; SANZ-COBENA et al. 2014; SCHMATZ et al. 2020). Por isto, em diversos estudos com leguminosas como plantas de cobertura, os maiores fluxos ocorreram no início do experimento, devido ao maior N adicionado ao solo pela rápida decomposição dos resíduos (GOMES et al. 2009; BAYER et al. 2015; WEILER et al. 2018). No presente estudo, somente após os 60 DAI ocorreram as maiores precipitações pluviométricas, quando a disponibilidade de N mineral estava baixa e o EPSA era inferior a 70% devido a maior absorção de N e água pelo milho, que se encontrava em pleno desenvolvimento. Como exemplo, no período entre 120 e 124 DAI, ocorreu a maior precipitação registrada durante o experimento (142,3mm), porém, devido ao

EPSA não ultrapassar 69% e o teor de N mineral estar baixo, foram verificados fluxos de N₂O em níveis basais. Assim, um fator que contribuiu no presente experimento para a redução das emissões de N₂O foi o desencontro entre as altas disponibilidades de N mineral e os maiores porcentagens de EPSA no solo. Ainda que as plantas de cobertura, em especial as leguminosas, possam aumentar as emissões de N₂O do solo, há outros aspectos a serem considerados como o fornecimento de N às plantas cultivadas em sucessão, a melhoria das propriedades químicas, físicas e biológicas do solo, e o fato de que a biomassa produzida pelas culturas, pode compensar as emissões de N₂O pelo C adicionado ao solo (BAYER et al. 2016). Além disso, o N adicionado ao solo pela ervilhaca pode substituir parcialmente a adubação nitrogenada com fertilizantes sintéticos na cultura do milho, que apresentam elevado gasto energético para a sua produção e são grandes emissores de N₂O na sua lavoura.

Em geral, os fluxos diários de CO₂ foram maiores nas maiores quantidades de resíduo. Nos primeiros três dias do experimento foram observados os maiores picos de CO₂, especialmente nos tratamentos com 6 e 9 Mg ha⁻¹. Devido ao reduzido tempo em que os resíduos estavam em contato com o solo, pelo menos a emissão observada no 1º DAI pode ser atribuída a respiração dos tecidos da ervilhaca (SANZ-COBENA et al. 2014). Os picos nas emissões de CO₂ observados aos 49, 58 e 61 DAI resultam da maior atividade microbiana em resposta aos valores de umidade do solo mais adequados em consequência de precipitações pluviométricas de 10.3, 23.0 e 28.4 mm ocorridas nestes dias, respectivamente. Também cabe destacar que os picos de emissão de N₂O aos 7, 25 e 28 DAI coincidiram com os maiores fluxos de CO₂, indicando alta atividade microbiana do solo.

O cultivo do milho, através do seu sistema radicular, pode modificar a estrutura do solo, liberar rizodeposições, estimular os microrganismos do solo, modificar a temperatura do solo (pelo sombreamento), absorver grandes quantidades de água e nutrientes (BARDGETT et al. 2014), etc. Todos estes fatores influenciam direta ou indiretamente as emissões de N₂O. Pilecco et al. (2019) verificaram que o azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) semeado no final do ciclo da soja, em sistema de integração lavoura pecuária, pode reduzir as emissões de N₂O devido principalmente a redução da disponibilidade de N mineral no solo. Singh et al. 2020 observaram que as culturas de ervilha forrageira e aveia terminadas em estágio precoce e tardio e após incorporadas ao solo forneceram mais N para o cultivo subsequente de milheto do que o solo sem resíduo. Isso foi verificado a partir das maiores quantidades de N na biomassa do milheto. Assim como observamos neste trabalho através do maior acúmulo de N na biomassa das plantas de milho cultivadas sobre 6 e 9 Mg MS ha⁻¹. A absorção pelo milho do N e da água no solo, diminuiu os teores disponíveis deste nutriente no solo e por consequências a magnitude dos

processos de nitrificação e desnitrificação. Por isto, as emissões de N₂O para a atmosfera corresponderam a uma baixa porcentagem (em média de 0.28%) do total N adicionado ao solo pelos resíduos. Este valor representa o Fator de Emissão (EF) e foi inferior ao valor padrão de 1% do IPCC (2014). Ao definir um valor fixo para EF assume-se que os valores apresentam uma relação linear com a quantidade de N adicionado (LASHERMES et al. 2022), condição que não foi observada no presente estudo e naquele realizado por Schmatz et al. (2020) ao comparar resíduos de trigo e ervilhaca. Gomes et al. (2009), também obtiveram baixos EF (0.39-0.75%) em experimento com cultivo de milho sobre resíduos de leguminosas. Essa diferença no valor do EF obtido no presente estudo em relação ao do IPCC (2014) reforça a importância da realização de estudos sobre a emissão de N₂O para a obtenção dos fatores de emissão locais para uso em inventários sobre a emissão deste potente GEE.

Neste trabalho também avaliamos a expressão gênica relativa *in situ* do gene *nirK* e *nosZ* das duas datas com as maiores emissões de N₂O (2 e 28 DAI). Nossos resultados indicaram que a comunidade de microrganismos desnitrificante estava presente e ativa nos momentos avaliados. Porém, as expressões gênicas foram detectáveis para apenas dois dos genes estudados: *nirK* e *nosZ*. As maiores expressões relativas detectadas para *nirK* ocorreram nos tratamentos com menores emissões de N₂O. Esperava-se que nas maiores emissões de N₂O ocorressem as maiores expressões do gene *nir*, como observado por Vieira et al. (2019), que correlacionou positivamente as emissões de N₂O com as expressões de *nirK* em um estudo com três estações de tratamento de águas residuais. Nossos resultados podem estar relacionados com a diversidade do gene *nirK* entre os microrganismos (WERTZ et al. 2009) e a não detecção do gene *nirS* em nosso estudo. Tosi et al. (2020) utilizando RT-qPCR absoluta, observaram uma tendência de relação inversa entre a expressão de *nirK* e as emissões de N₂O, porém observaram relação direta entre quantidade de transcritos do gene *nirS* e os fluxos gasosos, em experimento com aplicação de fertilizantes nitrogenados e inibidores de nitrificação.

A expressão do gene *nosZ* foi maior no tratamento com solo descoberto (menor emissão de N₂O) em comparação ao solo dos tratamentos com resíduos, nas duas datas avaliadas. A maior expressão de *nosZ* em menores emissões deste gás também foi observado por outros autores (NÉMETH et al. 2014). Os estudos sugerem que o baixo fornecimento de C orgânico pode favorecer a desnitrificação completa, com maiores expressões do *nosZ*, maiores emissões de N₂ e menores de N₂O. Ao analisar a abundância absoluta do gene do *nosZI*, Surey et al. (2020) discutem que em condições limitantes, como baixa disponibilidade de C e baixa oxigenação, a comunidade bacteriana tende a ser mais eficiente no uso dos aceptores finais, emitindo preferencialmente N₂. Esta explicação também se aplica no comportamento dos

tratamentos aos 28 DAI, onde há maiores expressões do *nosZ* nos tratamentos com menor disponibilidade de C e menores emissões de N₂O. Henderson et al. (2010) quantificaram por RT-qPCR absoluta os níveis de mRNA de *nosZ* após a adição de fontes de C ao solo, em um estudo conduzido em laboratório. Os menores níveis de mRNA deste gene foram encontrados nos solos com adição da glicose (fonte de C simples) se comparado aos solos com resíduos vegetais (fonte de C complexa).

Nossos resultados não comprovaram a hipótese de que a emissão de N₂O aumenta com o aumento da quantidade de resíduo de ervilhaca depositada sobre o solo. Os resíduos adicionaram quantidades crescentes de N ao solo, porém após seu estabelecimento, as plantas de milho atuaram como um competidor da comunidade microbiana e absorveram maiores quantidades de N quanto maior a quantidade de resíduo adicionada ao solo. Esta é uma explicação que somente poderia ser comprovada em um experimento comparando-se tratamentos com resíduos de ervilhaca cultivados e não cultivados com milho. Porém, como as diferentes quantidades de N depositados pelo resíduo modularam a quantidade absorvida deste nutriente pelas plantas de milho, esta explicação parece ser plausível. Desta forma, comprovou-se a segunda hipótese de que a absorção de N mineral pelas plantas de milho reduz a sua disponibilidade no solo e por consequência as emissões de N₂O. Por fim, também foi comprovado que há diferentes níveis de expressão de importantes genes do processo de desnitrificação nos diferentes níveis de emissões de N₂O. Para os dois genes detectados nas amostras de solo, *nirK* e *nosZ*, observou-se que as maiores expressões relativas ocorreram nos tratamentos com as menores emissões de N₂O. Há diferentes genes *nir* na comunidade microbiana e a não detecção do gene *nirS* e baixa expressão do gene *nirK* pode indicar que outros genes *nir* tenham maior importância para as emissões de N₂O no solo avaliado. Para o *nosZ* relaciona-se este comportamento com o C disponível no solo, onde foi discutido que em condições de baixa disponibilidade desse nutriente para a comunidade microbiana do solo (solo descoberto) há maior expressão do gene *nosZ* e menores emissões de N₂O.

As limitações inerentes a um trabalho desta complexidade são muitas e podem ser decorrentes das limitações da técnica, como a inadequada cobertura dos primers atualmente usados para alguns dos genes utilizados (BRAKER e CONRAD, 2011), além da complexidade do ciclo do N (já que a emissão de N₂O pode ser oriunda de inúmeros processos microbianos) (BUTTERBACH-BAHL et al. 2013), dos desafios da extração de RNA e da obtenção de resultados que representem as complexas etapas regulatórias entre a transcrição de genes e atividade (LIU et al. 2010; TATTI et al. 2012) e da diversidade e complexidade da comunidade desnitrificante do solo (HENDERSON et al. 2010; BRAKER e CONRAD, 2011). Sugere-se o

desenvolvimento de mais estudos a campo, que busquem estudar outras condições ambientais e entender melhor a dinâmica de outros importantes genes, como o *norB*, que está intimamente ligado a produção de N₂O e que não foi detectável em nossas condições. O solo é um ambiente complexo e o estudo das relações existentes entre os fluxos gasosos e os fatores que norteiam a emissão é desafiador (TOSI et al. 2020), porém necessário para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável.

2.6 CONCLUSÃO

As emissões acumuladas de N₂O durante o período do experimento não são proporcionais as quantidades de resíduos de ervilhaca depositadas sobre o solo. Quanto maiores as quantidades de resíduos, maior é a absorção de N pelas plantas de milho, menor é a disponibilidade de N mineral no solo, o que somada a uma condição de déficit hídrico, reduz as emissões de N₂O. As expressões dos genes chaves do ciclo do N *nirK* e *nosZ* pela comunidade desnitrificante são menores quando há maiores emissões de N₂O no solo.

2.7 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos, nível mestrado. Ao Departamento de solos da UFSM pelo fornecimento de estrutura para condução de experimento a campo e análises laboratoriais. Ao Laboratório de Virologia da UFSM pelo empréstimo de equipamentos e reagente necessário para a realização de inúmeras análises.

2.8 REFERÊNCIAS

AITA, C. *et al.* Consorciação de plantas de cobertura antecedendo o milho em plantio direto. I – Dinâmica do N no solo. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 28, p. 739-749, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832004000400014>. Acesso em: 24 de novembro de 2021.

ANGNES, G. *et al.* Correlating denitrifying catabolic genes with N₂O and N₂ emissions from swine slurry composting. **Bioresource Technology**, v. 140, p. 368-375, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013>. Acesso em: 14 de abril de 2021.

BRAKER, G.; CONRAD, R. Diversity, structure, and size of N₂O-producing microbial communities in soils-What matters for their functioning? *In*: LASKIN, A.I.; GADD, G.M. **Advances in Applied Microbiology**, v. 75, p. 33-70, 2011. DOI: 10.1016/B978-0-12-387046-9.00002-5. Acesso em: 18 de janeiro de 2022.

BAYER, C. *et al.* Soil nitrous oxide emissions as affected by long-term tillage, cropping systems and nitrogen fertilization in Southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, v.146, p. 213-222, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2014.10.011>. Acesso em: 22 de novembro de 2021.

BAYER, C. *et al.* Mitigating greenhouse gas emissions from a subtropical Ultisol by using long-term no-tillage in combination with legume cover crops. **Soil & Tillage Research**, v. 161, p. 86-94, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2016.03.011>. Acesso em: 22 de novembro de 2021. Acesso em: 22 de novembro de 2021.

BARDGETT, R.D.; MOMMER, L.; VRIES, F.T. Going underground: root traits as drivers of ecosystem processes. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 29, p. 692-699, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2014.10.006>. Acesso em: 03 de julho de 2020.

BASCHE, A.D. *et al.* Do cover crops increase or decrease nitrous oxide emissions? A meta-analysis. **Journal of Soil and water conservation**, v.69, n.6, 2014. DOI: 10.2489/jswc.69.6.471. Acesso em: 27 de outubro de 2021.

BOWEN, H. *et al.* Spatial patterns of microbial denitrification genes change in response to poultry litter placement and cover species in na agricultural soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 54, p. 769-781, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00374-018-1301-x>. Acesso em: 13 de maio de 2020.

BROZYNA, M.A. *et al.* Effects of grass-clover management and cover crops on nitrogen cycling and nitrous oxide emissions in a stochless organic crop rotation. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.181, p. 115-126, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2013.09.013>. Acesso em: 08 de abril de 2020.

BUTTERBACH-BAHL, K. *et al.* Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls? **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 368, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0122>. Acesso em: 05 de junho de 2020.

CERA, J.C. Cenário da estiagem está se agravando dia após dia no RS, avalia o IRGA. **Planeta arroz**, 2021. Disponível em: <https://planetaarroz.com.br/cenario-da-estiagem-esta-se-agravando-dia-apos-dia/>. Acesso em: 24 de janeiro de 2022.

CRUTZEN, P.J.; EHHALT, D.H. Effects of Nitrogen Fertilizers and Combustion on the Stratospheric Ozone Layer. **Ambio**, v. 6, n. 2/3, p. 112-117, 1977. Acesso em: 05 de janeiro de 2022.

DANDIE, C.E. *et al.* Nitric Oxide Reductase-Targeted Real-Time PCR Quantification of Denitrifier Populations in Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 13, p. 4250-4258, 2007. DOI: 10.1128/AEM.00081-07. Acesso em: 30 de janeiro de 2022.

DIETRICH, G., *et al.* Gradient of decomposition in sugarcane mulches of various thicknesses. **Soil & Tillage Research**, v. 192, p. 66-75, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.still.2019.04.022>. Acesso em: 24 de novembro de 2021.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Sistema**

Brasileiro de Classificação dos Solos. 3.ed. Brasília: Embrapa, 353p., 2013.

FARQUHARSON, R.; BALDOCK, J. Concepts in modelling N₂O emissions from land use. **Plant and Soil**, v.309, p.147-167, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9485-0>. Acesso em: 04 de novembro de 2021.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, vol.38, n.2, p. 109-112, 2014.

GOMES, J. *et al.* Soil nitrous oxide emissions in long-term cover crops-based rotations under subtropical climate. **Soil & Tillage Research**, v. 106, p. 36-44, 2009. DOI: 10.1016/j.still.2009.10.001. Acesso em: 08 de abril de 2020.

HAYATSU, M.; TAGO, K.; SAITO, M. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. **Soil Science and Plant Nutrition**, 54:1, p. 33-45, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00195.x>. Acesso em: 04 de novembro de 2021. Acesso em: 18

HENDERSON, S.L. *et al.* Changes in Denitrifier Abundance, Denitrification Gene mRNA Levels, Nitrous Oxide Emission, and Denitrification in Anoxic Soil Microcosms Amended with Glucose and Plant Residues. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 7, p. 2155-2164, 2010. DOI: 10.1128/AEM.02993-09. Acesso em: 18 de janeiro de 2022.

HENRY, S. *et al.* Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 59, p. 327-335, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.07.002>. Acesso em: 05 de janeiro de 2022.

HENRY, S. *et al.* Quantitative Detection of the *nosZ* Gene, Encoding Nitrous Oxide Reductase, and Comparison of the Abundance of *16S rRNA*, *narG*, *nirK*, and *nosZ* Genes in Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 5181-5189, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00231-06>. Acesso em: 05 de janeiro de 2022.

IPCC, 2014. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer. DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004. Acesso em: 16 de dezembro de 2021.

INMET, 2022. Instituto Nacional de Meteorologia. Estação automática de Santa Maria. Disponível em: <https://portal.inmet.gov.br/>. Acesso em: 17 de janeiro de 2022.

LASHERMES, G. *et al.* N₂O emissions from decomposing crop residues are strongly linked to their initial soluble fraction and early C mineralization. **Science of The Total Environment**, v. 806, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150883>. Acesso em: 02 de novembro de 2021.

LINN, D.M.; DORAN, J.W. Effect of Water-Filled Pore Space on Carbon Dioxide and Nitrous Oxide Production in Tilled and Nontilled Soils. **Soil Science Society of America Journal**, v. 48, 1984. DOI: <https://doi.org/10.2136/sssaj1984.03615995004800060013x>. Acesso em: 13 de fevereiro de 2022.

- LIU, B. *et al.* Denitrification gene pools, transcription and kinetics of NO, N₂O and N₂ production as affected by soil pH. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 72, p. 407-417, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00856.x>. Acesso em: 13 de abril de 2021.
- MCTIC – Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Estimativas anuais de emissões de gases de efeito estufa no Brasil, 5^a ed. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/mcti/pt-br/acompanhe-o-mcti/sirene/publicacoes/estimativas-anuais-de-emissoes-gee>. Acesso em: 23 de janeiro de 2022.
- MICHOTÉY, V.; MÉJEAN, V.; BONIN, P. Comparison of Methods for Quantification of Cytochrome *cd₁*-Denitrifying Bacteria in Environmental Marine Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1564-1571, 2000. DOI: 10.1128/aem.66.4.1564-1571.2000. Acesso em: 16 de junho de 2020.
- MILLER, M.N. *et al.* Crop residue influence on denitrification, N₂O emissions and denitrifier Community abundance in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 2553-2562, 2008. DOI: 10.1016/j.soilbio.2008.06.024. Acesso em: 06 de janeiro de 2022.
- MOSIER, A.R.; DORAN, J.W.; FRENEY, J.R. Managing soil denitrification. **Journal of Soil and Water Conservation**, v. 57, n. 6, p. 505-513, 2002. Acesso em: 11 de novembro de 2021.
- MUYZER, G.; WAAL, E.C. de.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.59.3.695-700.1993>. Acesso em: 30 de janeiro de 2022.
- NÉMETH, D.D.; WAGNER-RIDDLE, C.; DUNFIELD, K.E. Abundance and gene expression. In nitrifier and denitrifier communities associated with a field scale spring thaw N₂O flux event. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 73, p. 1-9, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.02.007>. Acesso em: 15 de janeiro de 2022.
- PILECCO, G.E. *et al.* Ryegrass early sowing into soybean to mitigate nitrous oxide emissions in a subtropical integrated crop-livestock system. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 272, p. 276-284, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.11.006>. Acesso em: 30 de janeiro de 2022.
- PIMENTEL, L.G. *et al.* Soil N₂O emissions following cover-crop residues application under two soil moisture conditions. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 178, p. 631-640, 2015. DOI: 10.1002/jpln.201400392. Acesso em: 22 de novembro de 2021.
- PINHEIRO, P.L. *et al.* N₂O emission increases with mulch mass in a fertilized sugarcane cropping system. **Biology and Fertility of Soils**, v. 55, p. 511-523, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00374-019-01366-7>. Acesso em: 24 de novembro de 2021.
- POTT, L.P. *et al.* Effect of hairy vetch cover crop on maize nitrogen supply and productivity at varying yield environments in Southern Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 759, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144313>. Acesso em: 19 de janeiro de 2022.

R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

RAVISHANKARA, A.R.; DANIEL, J.S.; PORTMANN, R.W. Nitrou Oxide (N₂O): The Dominant Ozone-Depleting Substance Emitted in the 21st Century. **Science**, v. 326, p. 123-125, 2009. DOI: 10.1126/science.1176985. Acesso em: 06 de abril de 2022.

REDIN, M., *et al.* How the Chemical composition and heterogeneity of crop residue mixtures decomposing at the soil surface affects C and N mineralization. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 78, p. 65-75, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.07.014>. Acesso em: 05 de janeiro de 2022.

REEVES, S. *et al.* Quantifying nitrous oxide emissions from sugarcane cropping systems: optimum sampling time and frequency. **Atmospheric Environment**, v. 136, p. 123-133, 2016. DOI:10.1016/j.atmosenv.2016.04.008. Acesso em: 15 de dezembro de 2021.

REGAN, K. *et al.* Spatial and temporal dynamics of nitrogen fixing, nitrifying and denitrifying microbes in na unfertilizes grassland soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 109, p. 214-226, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.11.011>. Acesso em: 10 de março de 2020.

ROCHETTE, P.; BERTRAND, N. Soil-surface gas emissions, *In*: CARTER, M.R. (ed.). **Soil Sampling and Methods of Analysis**, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 851-861, 2008.

SANZ-COBENA, A. *et al.* Do cover crops enhance N₂O, CO₂ or CH₄ emissions from soil in Mediterranean arable systems? **Science of the Total Environment**, vol. 466-467, p. 164-174, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.023>. Acesso em: 08 de abril de 2020.

SCHMATZ, R. *et al.* How the mass and quality of wheat and vetch mulches affect drivrs of soil N₂O emissions. **Geoderma**, v. 372, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114395>. Acesso em: 06 de junho de 2020.

SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. **Nature Protocols**, v. 3, p. 1101-1108, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>. Acesso em: 19 de dezembro de 2021.

SINGH, H. *et al.* Soil N₂O emissions following termination of grass pea and oat cover crop residues with different maturity levels. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 183, p. 734-744, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/jpln.202000239>. Acesso em: 22 de janeiro de 2022.

SOIL SURVEY STAFF. **Keys to Soil Taxonomy**. United States Department of Agriculture – Natural Resources Conservation Servive. Twelfth Edition, 372p., 2014.

SOUZA, T.T. de. *et al.* Longer crop cycle lengths could offset the negative effects of climate change on Brazilian maize. **Agrometeotology**, v. 78, n. 4, p. 522-531, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20190085>. Acesso em: 19 de janeiro de 2022.

- SUREY, R. *et al.* Difference in labile soil organic matter explain potential denitrification and denitrifying communities in a long-term fertilization experimente. **Applied Soil Ecology**, v. 153, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103630>. Acesso em: 17 de janeiro de 2022.
- TATTI, E. *et al.* Short-Term Effects of Mineral dns Organic Fertilizer on Denitrifiers, Nitrous Oxide Emissions and Denitrification in Long-Term Amended Vineyard Soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 77, p. 113-122, 2012. DOI: 10.2136/sssaj2012.0096. Acesso em: 19 de janeiro de 2022.
- THROBÄCK, I.N. *et al.* Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 49, p. 401-417. DOI: 10.1016/j.femsec.2004.04.011, 2004. Acesso em: 30 de janeiro de 2022.
- TOSI, M. *et al.* Short-term response of soil N-cycling genes and transcripts to fertilization with nitrification and urease inhibitors, and relationship with field-scale N₂O emissions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 142, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107703>. Acesso em: 15 de janeiro de 2022.
- VELOSO, M.G.; CECAGNO, D.; BAYER, C. Legume cover crops under no-tillage favor organimineral association in microaggregates soil C accumulation. **Soil & Tillage Research**, v. 190, p. 139-146, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.still.2019.03.003>. Acesso em: 19 de janeiro de 2022.
- VIEIRA, A. *et al.* The link between nitrous oxide emissions, microbial Community profile and function from three full-scale WWTPS. **Science of the total environment**, v. 651, p. 2460-2472, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.132>. Acesso em: 07 de janeiro de 2022.
- WEILER, D.A. *et al.* Trade-off between C and N recycling and N₂O emissions of soils with summer cover crops in subtropical agrosystems. **Plant Soil**, v.433, p. 213-225, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3831-2>. Acesso em: 03 de janeiro de 2022.
- WERTZ, S.; DANDIE, C.E.; GOYER, C.; TREVORS, J.T.; PATTEN, L. **Diversity of nirK Denitrifying Genes and Transcripts in an Agricultural Soil**, v. 75, n. 23, p. 7365-7377, 2009. DOI: 10.1128/aem.01588-09. Acesso em: 19 de janeiro de 2022.
- WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION. WMO greenhouse gas Bulletin. The State of Greenhouse Gases in the Atmosphere Based on Global Observations through 2018. **World meteorological organization**, n. 15, ISSN 2078-0796, 2019. Acesso em: 02 de agosto de 2021.
- ZHU, X. *et al.* Different Driving Factors for Potential Activity of Ammonia-Oxidizing Archeae and Bacteria in Coastal Wetlands. **Research Square**, 2021. DOI: <https://orcid.org/0000-0002-8795-2041>. Acesso em: 18 de junho de 2021.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A importância e a complexidade do ciclo do N instiga cada vez o entendimento dos processos nele envolvidos. A adequada compreensão das etapas do ciclo resultará em maior eficiência no uso do N na agricultura, menor contaminação dos lençóis freáticos pela lixiviação de NO_3^- e menor contaminação da atmosfera pela emissão de N_2O . A agricultura, através da adoção de manejos racionais, também poderá contribuir para a mitigação da emissão de GEEs e para que consigamos recomendar manejos ambientalmente sustentáveis devemos desenvolver estudos em condições reais. Neste estudo, o uso de plantas de cobertura aumentou a emissão de N_2O , principalmente até o 31° DAI. O aumento esteve relacionado com os momentos em que o solo apresentou maior EPSA e maiores teores de N mineral (NH_4^+ e NO_3^-). A massa seca, C e N totais remanescentes também sofreram maior decréscimo após os dias iniciais do estudo. Em geral, a taxa de decomposição não foi afetada pela massa inicial de cada tratamento. Os valores de EPSA foram ligeiramente superiores na camada de 0,05m e a cobertura sobre o solo apresentou influência sobre a umidade do solo, principalmente na camada mais superficial: no 2° DAI serviu como barreira para chegada da água na superfície do solo e a partir do 43° DAI o EPSA não apresentou resultados diferentes estatisticamente devido a diminuição da camada de resíduo. O fator de emissão (EF) foi superior no solo com 3 Mg ha⁻¹. A cultura do milho apresentou maior teor de N em seus tecidos aéreos quanto maior a quantidade de resíduo sobre o solo, diminuindo o teor de N disponível no solo. A expressão dos genes *nirK* e *nosZ* apresentaram diferentes níveis de expressão conforme a dinâmica dos fluxos de N_2O . Os resultados obtidos através da expressão dos genes alvos, nos mostraram o quão importante é a realização de novos estudos, a fim de melhor caracterizar a comunidade bacteriana ativa mediante a diferentes condições ambientais.

4 REFERÊNCIAS

- BASCHE, A.D. *et al.* Do cover crops increase or decrease nitrous oxide emissions? A meta-analysis. **Journal of Soil and water conservation**, v.69. n.6, 2014. DOI: 10.2489/jswc.69.6.471. Acesso em: 27 de outubro de 2021.
- BASCHE, A.D. *et al.* Soil water improvements with long-term use of a winter rye cover crop. **Agricultural Water Management**, v.172, p.40-50, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.agwat.2016.04.006>. Acesso em: 27 de outubro de 2021.
- BAYER, C. *et al.* Soil nitrous oxide emissions as affected by long-term tillage, cropping systems and nitrogen fertilization in Southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, v.146, p. 213-

222, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2014.10.011>. Acesso em: 27 de novembro de 2021.

BERNHARD, A. The Nitrogen Cycle: Processes, Players and Human Impact. *Nature Education Knowledge*, v. 3, n. 10. Disponível em: <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-nitrogen-cycle-processes-players-and-human-15644632/>. Acesso em: 07 de janeiro de 2022.

BOCK, E.; WAGNER, M. Oxidation of Inorganic Nitrogen Compounds as na Energy Source. Chapter 1.16. In: DWORKIN, M. *et al.* **The Procaryotes: A handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry**, 3^a ed. v. 2, p. 457.495, 2006. DOI: 10.1007/0-387-30742-7_16. Acesso em: 12 de janeiro de 2022.

BOOTH, M.S.; SATARK, J.M.; RASTETTER, E. Controls on nitrogen cycling in terrestrial ecosystems: a synthetic analysis of literature data. **Ecological Society of America**, v. 75, p. 139-157, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1890/04-0988>. Acesso em: 12 de janeiro de 2022.

BRAKER, G.; CONRAD, R. Diversity, structure, and size of N₂O-producing microbial communities in soils-What matters for their functioning? In: LASKIN, A.I.; GADD, G.M. **Advances in Applied Microbiology**, v. 75, p. 33.70, 2011. DOI: 10.1016/B978-0-12-387046-9.00002-5. Acesso em: 18 de janeiro de 2022.

BROZYNA, M.A. *et al.* Effects of grass-clover management and cover crops on nitrogen cycling and nitrous oxide emissions in a stochless organic crop rotation. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.181, p. 115-126, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2013.09.013>. Acesso em: 08 de abril de 2020.

BUTTERBACH-BAHL, K. *et al.* Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls? **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 368, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0122>. Acesso em: 05 de junho de 2020.

CORREA-GALEOTE, D.; TORTOSA, G.; BEDMAR, E.J. Quantification of Functional Microbial Nitrogen Cycle Genes in Environmental Samples. *Metagenomics of the microbial Nitrogen Cycle: Theory, Methods and Appllications*, 2014. Acesso em: 08 de dezembro de 2021.

COSTA, E.; PÉREZ, J.; KREFT, J.U. Why is metabolic labour divided in nitrification? **Trends in Microbiology**, v. 14, p. 213-219, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.03.006>. Acesso em: 16 de dezembro de 2021.

DAIMS, H. *et al.* Complete nitrification by Nitrospira bacteria. **Nature**, v. 528, p. 504-509. 2015. DOI: 10.1038/nature16461, 2015. Acesso em: 16 de dezembro de 2021.

FARQUHARSON, R.; BALDOCK, J. Concepts in modelling N₂O emissions from land use. **Plant Soil**, v. 309, p. 147-167, 2008. DOI: 10.1007/s11104-007-9485-0. Acesso em: 04 de dezembro de 2021.

- FLORIO, A. *et al.* Effects of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on abundance and activity of ammonia oxidizers in soil. **Biol. Fertil. Soils**, v. 50, p. 795-807, 2014. DOI: 10.1007/s00374-014-0897-8. Acesso em: 31 de maio de 2021.
- GOMES, J. *et al.* Soil nitrous oxide emissions in long-term cover crops-based rotations under subtropical climate. **Soil & Tillage Research**, v. 106, p. 36-44, 2009. DOI: doi:10.1016/j.still.2009.10.001. Acesso em: 08 de abril de 2020.
- GRAHAM, A.M. *et al.* Chapter 14: Characterizing Bacterial Gene Expression in Nitrogen Cycle Metabolism with RT-qPCR. In: KLOTZ, M.G.; STEIN, L.Y. **Methods in Enzymology**, v.496, 524p, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386489-5.00014-2>. Acesso em: 07 de fevereiro de 2022.
- GUZMAN, J.; AL-KAISI, M.; PARKIN, T. Greenhouse Gas Emissions Dynamics as Influenced by Corn Residue Removal in Continuous Corn System. **Soil & Water Management & Conservation**, v. 79, p. 612-625, 2015. DOI: 10.2136/sssaj2014.07.0298. Acesso em: 02 de novembro de 2021.
- HAYATSU, M.; TAGO, K.; SAITO, M. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 54, n.1, p. 33-45, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00195.x>. Acesso em: 04 de novembro de 2021.
- HENDRIKS, J. *et al.* Nitric oxide reductases in bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1459, p. 266-273, 2000. Acesso em: 18 de janeiro de 2022.
- HERGOUALC'H, K. *et al.* Chapter 11: N₂O emissions from managed soils, and CO₂ emissions from lime and urea application. In: IPCC. **Agriculture, Forestry and Other Land Use: 2019 Refinement to the 2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories**, v. 4, 2019. Acesso em: 05 de janeiro de 2022.
- IPCC, 2014. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. In: Team CW, Pachauri RK, Meyer LA (eds). Climate change 2014 synthesis report. IPCC, Geneva, Switzerland, Cambridge and New York, p. 151., 2014. DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004. Acesso em: 16 de dezembro de 2021.
- KÖNNEKE, M. *et al.* Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. **Nature: Letters**, v. 437, 2005. DOI: 10.1038/nature03911. Acesso em: 12 de janeiro de 2022.
- KOPITTKE, P.M. *et al.* Soil and the intensification of agriculture for global food security. **Environment International**, v.132, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105078>. Acesso em: 28 de janeiro de 2022.
- LASHERMES, G. *et al.* N₂O emissions from decomposing crop residues are strongly linked to their initial soluble fraction and early C mineralization. **Science of The Total Environment**, v. 806, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150883>. Acesso em: 02 de novembro de 2021.

- LINTON, N.F. *et al.* Long-term diverse rotation alters nitrogen cycling bacterial groups and nitrous oxide emissions after nitrogen fertilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 149, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107917>. Acesso em: 15 de janeiro de 2022.
- LONG, A. *et al.* Co-Occuring Anammox, Denitrification, and Codenitrification in Agricultural Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 1, v. 79, p. 168-176, 2013. DOI: 10.1128/AEM.02520-12. Acesso em: 13 de dezembro de 2021.
- MITCHELL, D.C. *et al.* Cover crop effects on Nitrous Oxide Emissions: Role of Mineralizable Carbon. **Soil & Water Management & Conservation**, v.77, p. 1765-1773, 2013. DOI: 10.2136/sssaj2013.02.0074. Acesso em: 25 de outubro de 2021.
- MOSIER, A.R.; DORAN, J.W.; FRENEY, J.R. Managing soil denitrification. **Journal of Soil and Water Conservation**, v. 57, n. 6, p. 505-513, 2002. Acesso em: 11 de novembro de 2021.
- MUSHINSKI, R.M., PAYNE, Z.C., RAFF, J.D., CRAIG, M.E., PUSEDE, S.E., RUSCH, D.B., WHITE, J.R., PHILLIPS, R.P. Nitrogen cycling microbiomes are structures by plant mycorrhizal associations with consequences for nitrogen oxide fluxes in forests. **Glob. Change Biol.**, v. 27, p. 1068-1082, 2021. DOI: 10.1111/gcb.15439. Acesso em: 12 de dezembro de 2021.
- NÉMETH, D.D.; WAGNER-RIDDLE, C.; DUNFIELD, K.E. Abundance and gene expression. In nitrifier and denitrifier communities associated with a field sacale spring thaw N₂O flux event. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 73, p. 1-9, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.02.007>. Acesso em: 15 de janeiro de 2022.
- PARKIN, T.B. Soil Microsites as a Source of Denitrification Variability. **Soil Science Society America Journal**, v. 51, p. 1194-1199, 1987. DOI: <https://doi.org/10.2136/sssaj1987.03615995005100050019x>. Acesso em: 27 de outubro de 2021.
- PETERSON, S.O. *et al.* Tillage effects on N₂O emissions as influenced by a winter cover crop. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, p. 1509-1517, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.03.028>. Acesso em: 17 de dezembro de 2021.
- PIMENTEL, L.G. *et al.* Soil N₂O emissions following cover-crop residues application under two soil moisture conditions. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 178, p. 631-640, 2015. DOI: 10.1002/jpln.201400392. Acesso em: 22 de novembro de 2021.
- PINHEIRO., P.L. *et al.* N₂O emission increases with mulch mass in a fertilized sugarcane cropping system. **Biology and Fertility of Soils**, v. 55, p. 511-523, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00374-019-01366-7>. Acesso em: 24 de novembro de 2021.
- QIAO, C. *et al.* How inhibiting nitrification affects nitrogen cycle and reduces environmental impacts of anthropogenic nitrogen input. **Global Change Biology**, v. 21, p. 1249-1257, 2015. DOI: 10.1111/gcb.12802. Acesso em: 08 de abril de 2020.

QUEMADA, M. *et al.* Residual effect of synthetic nitrogen fertilizers and impact on Soil Nitrifiers. **European Journal of Agronomy**, v. 109, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eja.2019.125917>. Acesso em: 10 de março de 2020.

REGAN, K. *et al.* Spatial and temporal dynamics of nitrogen fixing, nitrifying and denitrifying microbes in a unfertilized grassland soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 109, p. 214-226, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.11.011>. Acesso em: 10 de março de 2020.

REX, D. *et al.* Fungal and bacterial contributions to codenitrification emissions of N₂O and N₂ following urea deposition to soil. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 110, p. 135-149, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10705-017-9901-7>. Acesso em: 22 de janeiro de 2022.

RINCÓN, L.E.C.; GUTIÉRREZ, F.A.A. Dinámica del ciclo nitrógeno y fósforo em suelos. **Revista Colombiana Biotecnología**, vol. 14, n. 1, p. 285-295, 2012. Acesso em: 16 de dezembro de 2021.

RÜTTING, T.; ARONZZON, H.; DELIN, S. Efficient use of nitrogen in agriculture. **Nutr. Cycl. Agroecosyst**, v. 110, p. 1-5, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10705-017-9900-8>. Acesso em: 12 de janeiro de 2022.

SCHMATZ, R. *et al.* How the mass and quality of wheat and vetch mulches affect drivers of soil N₂O emissions. **Geoderma**, v. 372, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114395>. Acesso em: 06 de junho de 2020.

SMEETS, E.M.W. *et al.* Contribution of N₂O to the greenhouse gas balance of first generation biofuels. **Glob Chang Biol**, v. 15, p.1-23, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01704.x>. Acesso em: 28 de janeiro de 2022.

SMITH, C.; HILL, A.K.; TORRENTE-MURCIANO, L. Current and future role of Haber-Bosch ammonia in a carbon-free energy landscape. **Energy & Environmental Science**, v. 13, p. 331-344, 2020. DOI: [10.1039/C9EE02873K](https://doi.org/10.1039/C9EE02873K). Acesso em: 07 de abril de 2020.

STEIN, L.Y.; KLOTZ, M.G. The nitrogen cycle. **Current Biology Magazine**, v. 26, p. R83-R101, 2016. Acesso em: 29 de novembro de 2021.

SU, Q. *et al.* Abiotic Nitrous Oxide (N₂O) Production Is Strongly pH Dependent but Contributes Little to Overall N₂O Emissions in Biological Nitrogen Removal Systems. **Environmental Science & Technology**, v. 53, p. 3508-3516, 2019. DOI: [10.1021/acs.est.8b06193](https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06193). Acesso em: 22 de janeiro de 2021.

SUREY, R. *et al.* Difference in labile soil organic matter explain potential denitrification and denitrifying communities in a long-term fertilization experimente. **Applied Soil Ecology**, v. 153, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103630>. Acesso em: 17 de janeiro de 2022.

TANIMOTO, T. *et al.* Co-denitrification by the denitrifying system of the fungus *Fusarium oxysporum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 93, p. 177-180, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05086.x>. Acesso em: 14 de dezembro de 2021.

TOSI, M. *et al.* Short-term response of soil N-cycling genes and transcripts to fertilization with nitrification and urease inhibitors, and relationship with field-scale N₂O emissions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 142, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107703>. Acesso em: 15 de janeiro de 2022.

VAN GROENIGEN, J.W. *et al.* The soil N cycle: new insights and key challenges. **Soil**, v. 1, p. 235-256, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5194/soil-1-235-2015>. Acesso em: 29 de novembro de 2021.

WEILER, D.A. *et al.* Trade-off between C and N recycling and N₂O emissions of soils with summer cover crops in subtropical agrosystems. **Plant Soil**, v.433, p. 213-225, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3831-2>. Acesso em: 03 de janeiro de 2022.

WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION. WMO greenhouse gas Bulletin. The State of Greenhouse Gases in the Atmosphere Based on Global Observations through 2018. **World meteorological organization**, n. 15, ISSN 2078-0796, 2019. Acesso em: 20 de janeiro de 2022.

WU, D. *et al.* Nitrification inhibitors mitigate N₂O emissions more effectively under straw-induced conditions favoring denitrification. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 104, p. 197-207, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.10.022>. Acesso em: 06 de janeiro de 2022.

ZEHR, J.P.; KUDELA, R.M. Nitrogen Cycle of the Open Ocean: From Genes to Ecosystems. **Annu. Ver. Marine Sci.**, v.3, p. 197-225, 2011. DOI: [10.1146/annurev-marine-120709-142819](https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142819). Acesso em: 29 de novembro de 2021.

ZHU, X. *et al.* Different Driving Factors for Potential Activity of Ammonia-Oxidizing Archeae and Bacteria in Coastal Wetlands. **Research Square**, 2021. DOI: <https://orcid.org/0000-0002-8795-2041>. Acesso em: 18 de junho de 2021.

ZUMFT, W.G. Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 4, p. 533-616, 1997. DOI: [10.1128/mubr.61.4.533-616.1997](https://doi.org/10.1128/mubr.61.4.533-616.1997). Acesso em: 16 de dezembro de 2021.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 1S - Condições utilizadas nas reações de RT-qPCR para cada par de primer.

Gene	Primer	Condições de amplificação
<i>16S rRNA</i>	338F	De acordo com o gene alvo
	518R	
<i>nirK</i>	nirK1040	95° C – 10 min; 46 ciclos de: 95° - 20 s, 60°C – 60 s e 72°C – 30 s. ¹
	nirK876	
<i>nosZ</i>	nosZ2F	95°C – 15 min; 46 ciclos de: 95°C – 15 s, 62°C – 30 s; 72° - 15 s e 80° - 15 s (coleta de dados). ¹ (Adaptado de Köbke et al. 2018)
	nosZ2R	

¹ Após, curva de melting: 95°C – 15 s; 60°C – 60 s; 95°C – 15 s.

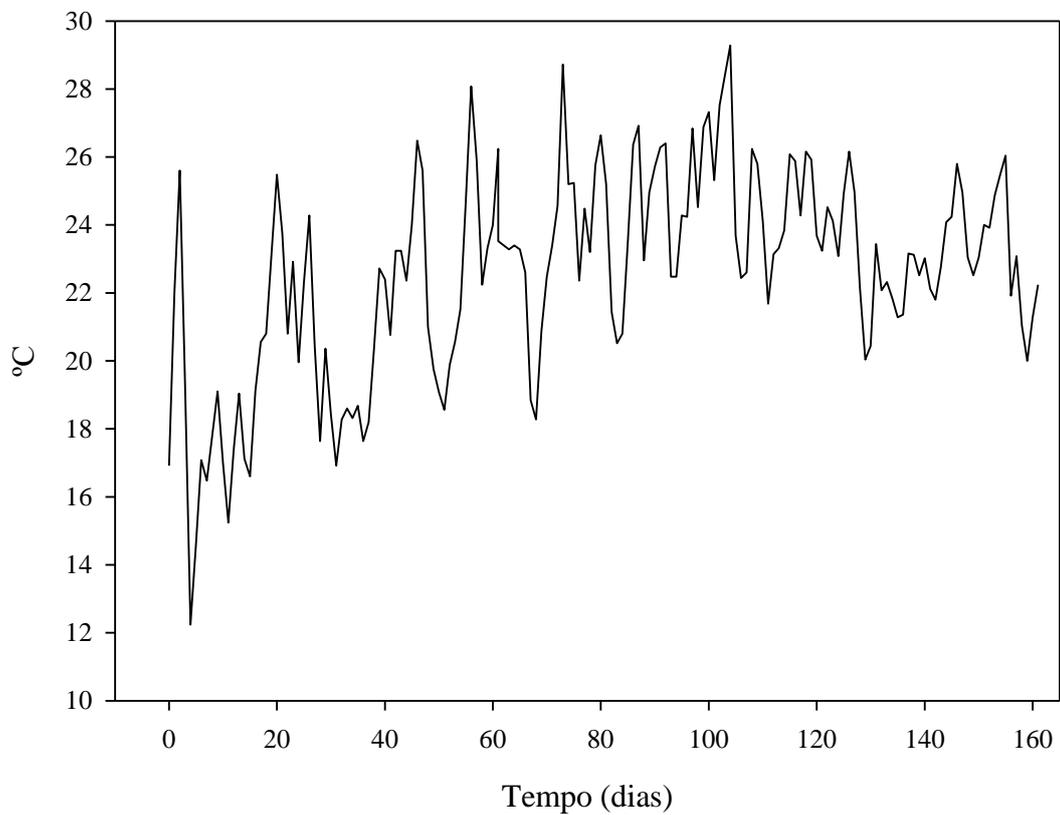
Tabela 2S - Volumes e concentrações de reagentes utilizadas nas reações de RT-qPCR para cada par de primer.

Reagente	Conc. Inicial	<i>16S rRNA</i>		<i>nirK</i>		<i>nosZ</i>	
		Vol/ reação (µL)	Conc. Final	Vol/ reação (µL)	Conc. final	Vol/ reação (µL)	Conc. Final
QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix	2x	7.5	1x	7.5	1x	7.5	1x
ROX Ref. Dye	-	1.5	1x	1.5	1x	1.5	1x
Primer A	10.0 uM	0.4	267Nm	0.55	367nM	0.55	367nM
Primer B	10.0 uM	0.4	267Nm	0.55	367nM	0.55	367nM
BSA	100.0 µg mL ⁻¹	1.5	10.0 µg mL ⁻¹	1.5	10.0 µg mL ⁻¹	1.5	10.0 µg mL ⁻¹
Água	-	2.2	-	1.9	-	1.9	-
cDNA	-	1.5	-	1.5	-	1.5	-
Volume final	-	15	-	15	-	15	-

Tabela 3S – Teores de C acumulados nos tecidos do milho cultivado sobre diferentes quantidades de resíduo de ervilhaca em condições de baixa disponibilidade hídrica.

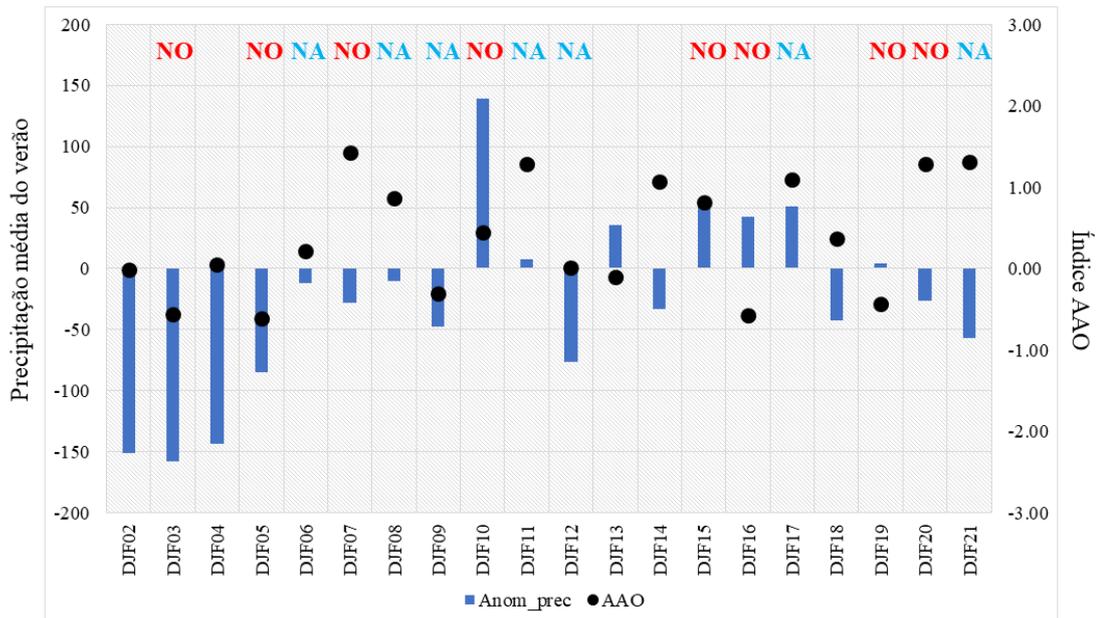
Tratamentos	Carbono (kg ha ⁻¹)	
	Parte aérea (florescimento)	Grãos + Parte aérea (maturação)
0 Mg MS ha ⁻¹	1657.71±218.87c	3205.96±290.54c
3 Mg MS ha ⁻¹	2553.25±236.12b	4468.15±506.38b
6 Mg MS ha ⁻¹	3070.47±229.06a	5090.55±296.51ab
9 Mg MS ha ⁻¹	3293.04±214.45a	5404.13±414.09 ^a
CV	7.78	7.98

Figura 1S - Temperatura média compensada do ar durante 161 dias de experimento.



Fonte: INMET, Estação convencional de Santa Maria, RS

Figura 2S – Precipitação média do verão em relação a normal climatológica (1980-2010) para a região de Santa Maria, RS, Brasil.



DJF: dezembro-janeiro-fevereiro (verão); NA: La niña; NO: El niño.

Fonte: INMET, National Centers for Environmental Information, National Weather Service

Tabela 4S – Influência de anomalias na precipitação na região de Santa Maria, RS, Brasil.

Precipitação Pluviométrica	Ano	Fenômeno ocorrente	
Acima do normal	2010	NO AAO+	
	2011	NA AAO+	
	2013	neutro AAO-	
	2015	NO AAO+	
	2016	NO AAO-	
	2017	neutro AAO+	
	2019	NO AAO-	
	Abaixo do normal	2002	neutro AAO-
		2003	NO AAO-
2004		neutro AAO+	
2005		NO AAO-	
2006		NA AAO+	
2007		NO AAO+	
2008		NA AAO+	
2009		NA AAO-	
2012		NA AAO+	
2014		neutro AAO+	
2018		NA AAO+	
2020		NO AAO+	
2021	NA AAO+		

NO: El niño; NA: La niña; AAO: Oscilação Antártica.

Fonte: INMET, National Centers for Environmental Information, National Weather Service

REFERÊNCIAS

INMET, 2022. Instituto Nacional de Meteorologia. Estação automática de Santa Maria. Disponível em: <https://portal.inmet.gov.br/>. Acesso em: 17 de janeiro de 2022.

KÖBKE, S. *et al.* Post-harvest N₂O and CO₂ emissions related to plant residue incorporation of oilseed rape and barley straw depend on soil NO₃⁻ content. **Soil & Tillage Research**, v. 179, p. 105-113, 2018. DOI: doi.org/10.1016/j.still.2018.01.013. Acesso em: 12 de dezembro de 2021.

NATIONAL WEATHER SERVICE. Antarctic Oscillation (AAO). Disponível em: https://www.cpc.ncep.noaa.gov/products/precip/CWlink/daily_ao_index/ao/ao.shtml. Acesso em: 24 de janeiro de 2022.

NATIONAL CENTERS FOR ENVIRONMENTAL INFORMATION. El Niño/ Southern Oscillation (ENSO): Southern Oscillation Index (SOI). Disponível em: <https://www.ncdc.noaa.gov/teleconnections/enso/soi>. Acesso em: 24 de janeiro de 2022.

NATIONAL CENTERS FOR ENVIRONMENTAL INFORMATION. El Niño/Southern Oscillation (ENSO): Equatorial Pacific Sea Surface Temperatures (SST). Disponível em: <https://www.ncdc.noaa.gov/teleconnections/enso/sst>. Acesso em: 24 de janeiro de 2022.