

USO DE SENSOR DE FLUORESCÊNCIA ATIVA PARA IDENTIFICAR A DEFICIÊNCIA POR NITROGÊNIO E POTÁSSIO EM PLANTAS DE MILHO CULTIVADO EM AMBIENTE PROTEGIDO

RAFAEL SIQUEIRA¹, LOUIS LONGCHAMPS², RAJ KHOSLA³

¹ Eng^o. Agrônomo, mestrando em solos, Colorado State University, Fort Collins, CO., rafael.de_siqueira@colostate.edu

² Eng^o. Agrônomo, Prof. assistente, Colorado State University, Fort Collins, CO., louis.longchamps@colostate.edu

³ Eng^o. Agrônomo, Prof. Titular, Colorado State University, Fort Collins, CO., raj.khosla@colostate.edu

Apresentado no
Congresso Brasileiro de Agricultura de Precisão - ConBAP 2014
14 a 17 de setembro de 2014 - São Pedro - SP, Brasil

RESUMO: A tecnologia de fluorescência em tempo real aplicada em práticas de nutrição de plantas têm mostrado positivos resultados que contribuem para um melhor manejo na nutrição de precisão. O objetivo deste trabalho foi estudar e avaliar se uma plataforma com sensor de fluorescência induzida é capaz de detectar variabilidade de N e K no dossel do milho em estádios vegetativos iniciais. O estudo foi realizado em ambiente controlado (casa de vegetação), e as plantas foram cultivadas em vasos com areia de sílica. Utilizou-se a solução de Hoagland com diferentes doses (0%, 25%, 50% e 100%) de N e K. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA e teste de Tukey. Uma regressão linear foi ajustada junto com o coeficiente de determinação (R^2) e raiz quadrada do erro quadrático médio (RMSE) para estimar a precisão dos índices gerados pelo sensor. Os resultados demonstraram que todos os índices foram capazes de detectar variabilidade de N a partir do estágio de crescimento V3 quando apenas a deficiência de N estava presente. Não foi possível identificar deficiência de K já que os tratamentos apresentaram pouca variabilidade e os índices analisados serem específicos ao nitrogênio.

PALAVRAS-CHAVE: Fluorescência, milho, nitrogênio, potássio

DETECTING MAIZE NUTRIENTS VARIABILITY USING FLUORESCENCE SENSOR UNDER GREENHOUSE CONDITION

ABSTRACT: Real-time fluorescence sensing technology is fairly new for nutrient variable rate practices, and studies has shown that it can be an increment of information towards better precision nutrient management. The objective of this study was to evaluate if fluorescence sensing platform can detect variability of N and K in crop canopy at early growth stages of maize (prior to V6). Research was conducted under greenhouse conditions and plants were grown in pots with silica sand and supplied with modified Hoagland solution with different N and K rates. Sensor readings were analyzed using ANOVA and Tukey's HSD test to detect differences among nutrient rates, and linear regression were fitted along with coefficient of determination (R^2) and root square mean error (RSME) to estimate the precision of sensor's indices. Results showed that all indices were able to detect N variability prior to V3 growth stage when only N deficiency was present, but couldn't identify K deficiency as the K treatments has shown smaller variability at early stage and those indices has not been reported efficient for K.

KEYWORDS: remote sensing, fluorescence, maize, nitrogen, potassium

INTRODUÇÃO

O Nitrogênio (N) tem mais influência em crescimento, produtividade e qualidade do milho (*Zea mays*) do que qualquer outro nutriente, apresentando-se em maior quantidade na biomassa da cultura (Bender et al., 2013). Um desequilíbrio entre N aplicado e o requerido pela planta pode retardar o crescimento e impactar negativamente na produtividade quando aplicado em doses menores do que o exigido pela planta. Eventualmente, doses elevadas de nitrogênio podem causar riscos ambientais, e contaminação do lençol freático (Carpenter et al. 1998).

A aplicação incorreta de fertilizantes nitrogenados resultam em uma baixa eficiência do uso do nitrogênio gerando perdas econômicas. Apesar do aumento da utilização do N, a eficiência mundial do uso de nitrogênio para o milho é de apenas 50%, e em torno de 30% na média de todas as culturas (Baligar et al., 2001; Cassman et al., 2002). A adoção do manejo de nutrientes em taxas variadas é uma técnica que pode melhorar a eficiência do uso do nitrogênio (Gupta e Khosla, 2012)

O Sensoriamento remoto é uma técnica não destrutiva que pode colaborar no melhor mapeamento das unidades de gestão diferenciada, fazendo assim com que o produtor consiga entender melhor cada região da lavoura e passe a gerenciar esses locais individualmente. A reflectância tem sido estudada como uma excelente forma de mapear variabilidade de N, especialmente utilizando o índice de vegetação por diferença normalizada (NDVI). Comercialmente, sensores de dossel como o GreenSeeker™ possibilitam medições confiáveis entre os estádios de crescimento V8 a V12 (Martin et al., 2007). No entanto, a prática de adubação nitrogenada de cobertura na cultura do milho é feita até V6 para evitar danos físicos à planta.

A fluorescência de plantas medidas em laboratório tem demonstrado boas correlações com teores de clorofila e flavonóides, e uma nova técnica de sensoriamento baseado em fluorescência demonstrou eficácia em detectar variabilidade de N em milho a partir de V5 (Longchamps and Khosla, 2014). A partir do uso de novas tecnologias, como a Emissão de Luz por Diodos (LED) mais poderosos e sensores ópticos com maior sensibilidade a baixas intensidades de luz, a fluorescência pode ser medida de maneira instantânea com resultados confiáveis.

A hipótese deste estudo foi de que a fluorescência adquirida pelo sensor ativo Multiplex 3® (FORCE-A, Orsay, França) pode ser utilizada para previsão de deficiência de nitrogênio (N) e potássio (K) na cultura do milho sob condições de cultivo protegido. Os objetivos específicos do estudo foram, (1) verificar se fluorescência ativa pode detectar a variabilidade de N e K em milho, (2) determinar a acurácia na qual diferentes níveis nutricionais podem ser previstas em diferentes estádios vegetativos utilizando fluorescência induzida.

MATERIAL E MÉTODOS

O Milho foi cultivado em ambiente protegido na instituição Universidade do Estado do Colorado (CSU), situada na cidade de Fort Collins (CO, USA), com semeadura realizada no dia 26 de outubro de 2012 e emergência no dia 2 de novembro. Foram utilizados vasos de 11 litros (23 cm de diâmetro e 21 cm de altura) com 6 Kg de areia de sílica. Lâmpadas de intensidade alta (430W) foram utilizadas como fonte de luz para o ambiente por 16 horas diárias, e a temperatura variava entre 25°C a 20°C (dia/noite). Para o plantio foram adicionados 400 ml de água e em seguida cada pote recebeu cinco sementes de milho (Dekalb DKC45-79) posicionados de forma cruzada a dois centímetros de profundidade. Diariamente adicionava-se 80 ml de água em cada pote através de gotejamento superficial.

O estudo foi dividido em dois experimentos simultâneos. O primeiro experimento foi conduzido com variação nutricional de N (expN) enquanto o segundo com variação nutricional

de K (expK). Cada experimento foi dividido em quatro tratamentos com seis repetições, totalizando 24 parcelas. Os tratamentos do expN receberam diferentes dosagens de N tendo como base a solução hidropônica de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950). Para o experimento expN as dosagem foram 0%, 25%, 50% e 100% de N formulado com base na solução de Hoagland, enquanto o tratamento 100% foi considerado controle já que é a solução em si. As mesmas porcentagens de dosagens foram utilizadas para os tratamentos do expK, porém variando as concentrações de potássio na solução ao invés do nitrogênio. Os nutrientes utilizados para formulações de cada solução nutritiva e suas dosagens podem ser vistos na Tabela 1.

A quantidade aplicada de cada solução foi de 300 ml no dia 4 após a emergência e uma segunda aplicação da mesma quantidade de solução nutritiva foi aplicada no 28º após a emergência, nesse momento o estágio vegetativo da planta era V4 (quatro folhas formadas).

TABELA 1. Diferentes formulações de solução nutritiva com variações na quantidade de nitrogênio e potássio. Solução de Hoagland foi utilizada como testemunha e os tratamentos receberam dosagens diferentes de ambos os nutrientes apartir da dosagem recomendada pela testemunha.

Ingredientes	Solução estoque (g/L água)	Hoagland	Nitrogênio				Potássio		
		100%	50%	25%	0%	50%	25%	0%	
		ml / L							
KH ₂ PO ₄ (pH a 6.0 com 3M KOH)	136.09	1	1	1	1	-	-	-	
KNO ₃	101.11	5	2.5	1.25	-	-	-	-	
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	236.16	5	2.5	1.25	-	5	5	5	
MgSO ₄ x 7H ₂ O	247.47	2	2	2	2	2	2	2	
KCL	74.56	-	5	5	5	2.5	1.25	0	
CaCl ₂ x 2H ₂ O	147.02	-	5	5	5	-	-	-	
NH ₄ H ₂ PO ₄	115.31	-	-	-	-	1	1	1	
NH ₄ NO ₃	80.04	-	-	-	-	2	2	2	
NaH ₂ PO ₄	119.98	-	-	-	-	1	1	1	
Micros:	*	1	1	1	1	1	1	1	
Fe-EDTA:	**	1	1	1	1	1	1	1	

*Micros: micronutrientes. Solução estoque foi preparado com H₃BO₃ (2.86 g/L), MnCl₂ x 4H₂O (1.81 g/L), ZnCl₂ x 7H₂O (0.1g/L), CuCl₂ (0.04g/L) e H₂MoO₄.H₂O (0.02g/L)

**Fe-EDTA: Ácido-Férrico acético Tetra de Diamina do etileno. Solução estoque preparada apartir dos ingredientes: FeSO₄ x 7H₂O (24.9g/L), EDTA-Na (33.2g/L) e NAOH 1N (89ml/L)

Foram coletados 14 amostras de fluorescência entre os estádios vegetativos V3 a V6 através do sensor Multiplex 3[®]. Amostras foram coletadas a 10 cm de altura do sensor durante aproximadamente três segundos. O sensor possui quatro diferentes canais de excitação que emitem raios de diodos emissores de luz (LED) nos espectros: ultravioleta (UVA - 375nm), azul (470 nm), verde (515 nm) e vermelho (625). Para detectar a fluorescência, são utilizados três canais de detecção (filtros) localizados no centro do aparelho. Estes filtros são: amarelo (fluorescência amarela; 590 nm), vermelho (fluorescência vermelho; 678 nm) e vermelho-longe (fluorescência vermelho-longe; 750 nm) (FORCE-A, Orsay, França). Apesar de o aparelho gerar 12 combinações diferentes de dados, apenas sete índices de fluorescência foram analisados (Tabela 2). Esta escolha foi feita baseado em estudos anteriores que sugeriram alguns índices de balanço de nitrogênio e clorofila para detectar a variabilidade do N em plantas (Cerovic et al, 2002; Longchamps e Khosla, 2014).

TABELA 2. Descrição dos índices de vegetação avaliados e fórmula para obtenção dos índices a partir dos valores de fluorescência coletados pelo sensor (Multiplex 3).

Índices	Descrição	Fórmula †
NBI_R	Fluorescência vermelho-longe induzido por luz UV dividido por fluorescência vermelho induzido por luz vermelha	$NBI_R = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{FRF_{uv_i}}{RF_{r_i}}$
NBI_G	Fluorescência vermelho-longe induzido por luz UV dividido por fluorescência vermelho induzido por luz verde	$NBI_G = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{FRF_{uv_i}}{RF_{g_i}}$
NBI_B	Fluorescência vermelho-longe induzido por luz UV dividido por fluorescência vermelho induzido por luz azul	$NBI_B = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{FRF_{uv_i}}{RF_{b_i}}$
NBI1	Fluorescência vermelho-longe induzido por luz UV multiplicado por fluorescência vermelho-longe induzido por luz verde e dividido pela raiz quadrada da fluorescência vermelho-longe induzido por luz vermelho	$NBI_1 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{FRF_{uv_i} * FRF_{g_i}}{FRF_{r_i}^2}$
CHL	Fluorescência vermelho-longe induzido por luz vermelho dividido por fluorescência vermelho induzido por luz vermelha	$CHL = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{FRF_{r_i}}{RF_{r_i}}$
CHL1	Fluorescência vermelho-longe induzido por luz verde dividido por fluorescência vermelho induzido por luz vermelha	$CHL_1 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{FRF_{g_i}}{RF_{r_i}}$

† Banda indutora está subescrito . uv = ultravioleta; r = vermelho; g = verde; b = azul; FRF = Fluorescência vermelho-longe; RF = Fluorescência vermelha.

Amostras de biomassa foram coletadas no 36 dia após a emergência, quando a planta se apresentava no estágio vegetativo V6. As amostras continham duas plantas de cada parcela que após coletadas foram secas em estufa a 60° C. Após a secagens o material foi pesado e moído para análise foliar no intuito de identificar a quantidade de cada nutriente absorvido pelas plantas em cada parcela. Foram realizadas análise de teor total de N (%) pelo método de digestão de Kjeldahl, e para o teor de K (%) foi utilizado o método de digestão por ácido nítrico/peróxido de hidrogênio (Association of Official Analytical Chemists, 1990). As análises do tecido foliar foi realizado por Harris Laboratory (Lincoln, NE).

Multiplicando a biomassa seca (gramas) pelo teor de N (%) podemos obter uma estimativa do ganho de nitrogênio (gramas). Essa estimativa do ganho de N pelas plantas foi utilizada como indicador da variabilidade de N nas plantas para o expN. De forma similar, o ganho de potássio foi utilizado como indicador da variabilidade de K no expK. A análise estatística ANOVA e teste de Tukey ($\alpha = 0.05$) foram utilizados para detectar diferenças significativas entre os tratamentos de cada experimento. Para os dois experimentos foram realizados regressões lineares entre diferentes índices de fluorescência e a quantidade absorvida de N em cada uma das 14 coletas de dados realizadas entre V2 e V6 visando identificar o índice com maior poder de predição do estado nutricional das plantas. Além do coeficiente de determinação

(R^2) foi utilizado a raiz quadrada do erro quadrático médio (RMSE) para testar a precisão dos estimados. As análises estatísticas foram realizadas com o *software* estatístico R e as funções utilizadas foram “aov”, “TukeyHSD”, “lm” e “rmse” (Mangan et. al., 2011; R Development Core Team, 2012)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aplicação de soluções nutritivas com diferentes concentrações de N gerou uma variabilidade na biomassa do milho de 3 a 16 gramas, com diferença significativa ($\alpha = 0.05$) para todos os tratamentos (figura 1).

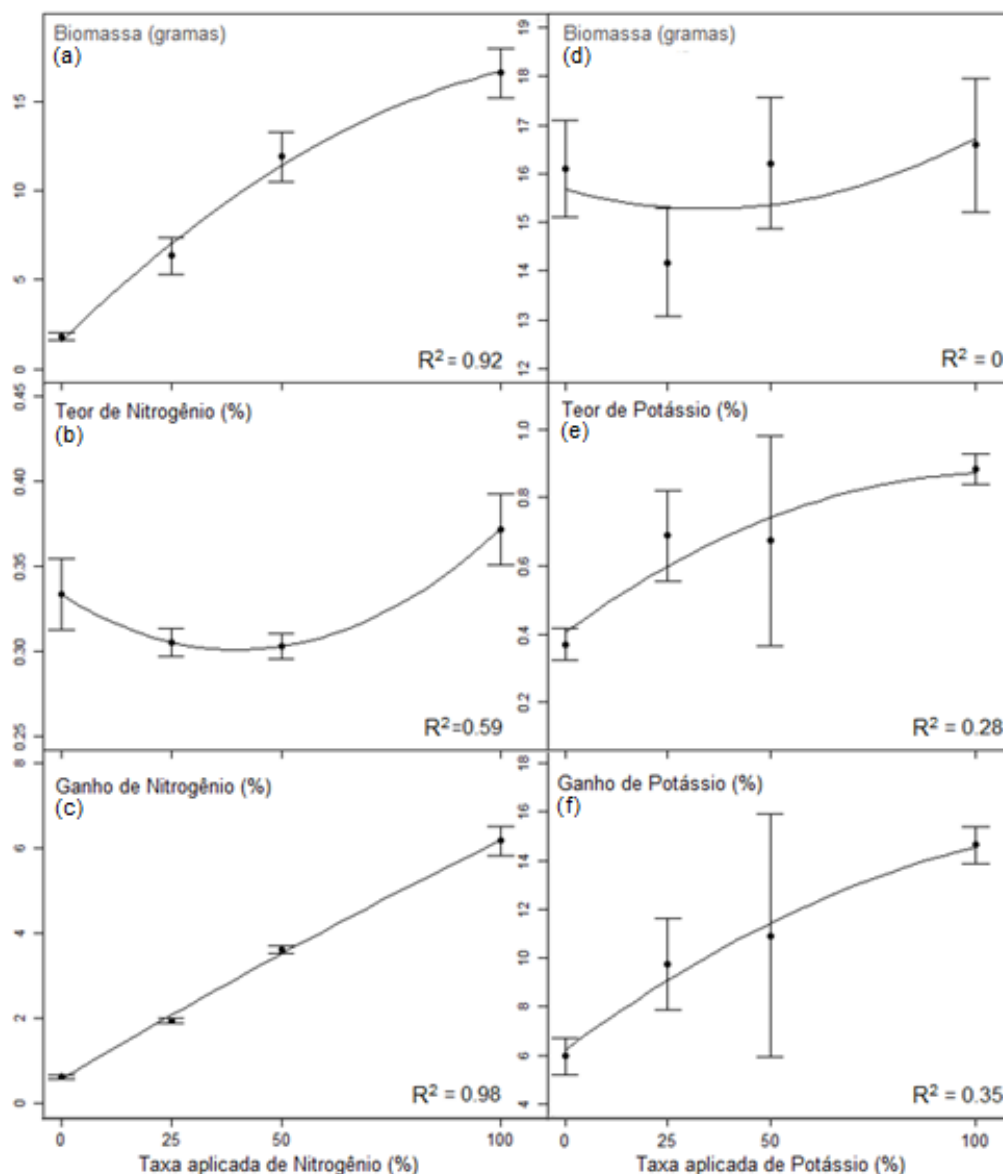


Figura 1. Resultado de biomassa (a), teor de N (b) e ganho de N (c) na planta de milho em função de diferentes taxas de nitrogênio aplicados em solução nutritiva, e biomassa (d), teor de K (e) e ganho de K (f) em função de diferentes taxas de potássio. A taxa 100% representa solução nutritiva de Hoagland. Amostras foram coletadas no 36º dia após emergência (estádio vegetativo V6). Barras de erros representam o intervalo de confiança ($\alpha = 0.05$). Os coeficientes de determinação estão indicados em cada gráfico (R^2).

Neste mesmo estágio vegetativo analisado, o teor de N (%) obteve uma variação pequena e não houve diferença significativa entre os tratamentos. O resultado do ganho de N foi semelhante ao da biomassa e apresentou diferença significativa para todos os tratamentos. Desta maneira, é possível observar que diferentes doses causaram variabilidade quanto à biomassa de milho produzida, porém o teor de N na planta não obteve variação significativa. Já o ganho de N, que considera ambos os fatores, mostrou alta relação com as diferentes taxas aplicadas de N. Diferentemente dos resultados obtidos com o ExpN, as diferentes doses de potássio não resultaram na variação da biomassa no estágio vegetativo analisado. Quanto ao teor de K na planta é possível observar que há uma relação positiva entre a quantidade de potássio aplicada na solução nutritiva e o teor do nutriente na biomassa. Assim, é possível observar que a absorção de potássio pelas plantas de milho também tem uma relação positiva com as doses de potássio aplicadas na solução de hoagland (Figura 1).

Todos os sete índices foram capazes de distinguir as diferentes doses de N a partir do 18º dia após emergência (estádio vegetativo V3), apresentando resultados semelhantes em todas as leituras seguintes. Figura 2 apresenta os três melhores índices baseado nos valores mais altos de R^2 e mais baixos de RMSE. Os dois índices do balanço de nitrogênio (azul e vermelho) e o índice de clorofila (CHL) apresentaram alta capacidade de detectar variabilidade de N em milho a partir de V2. Longchamps and Khosla (2014) detectaram variabilidade de N em milho a partir de V5 com os mesmo índices apresentados, porém em condições menos controladas (i.e. menor precisão dos nutrientes aplicados) utilizando solos ao invés de soluções nutritivas.

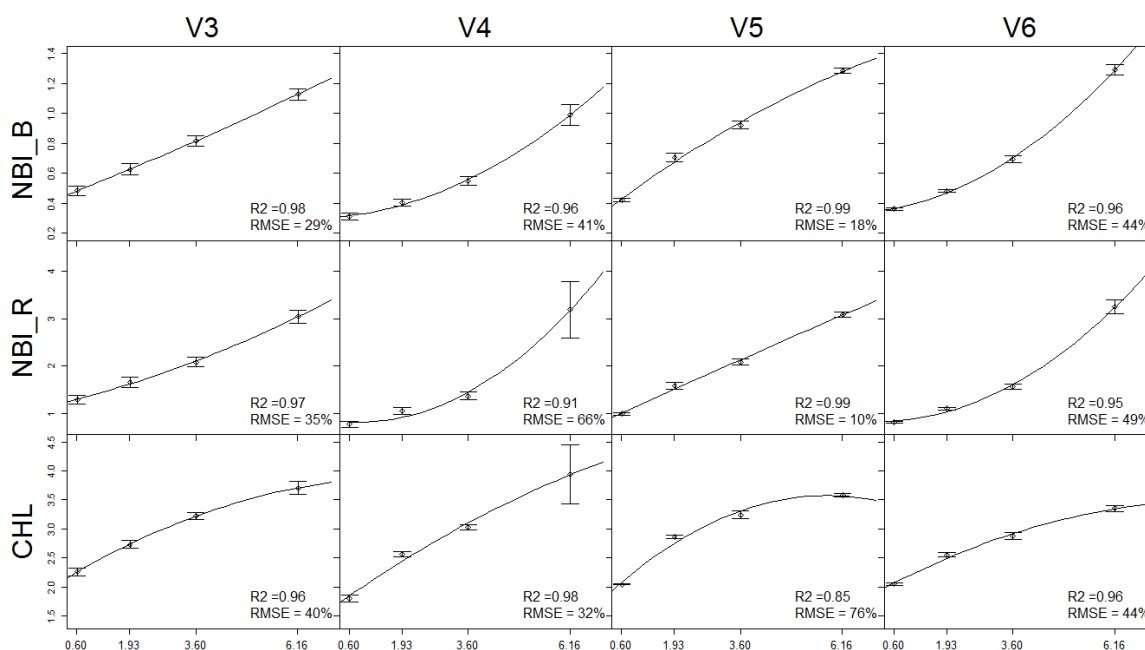


Figura 2. Relação dos índices de vegetação com o ganho de nitrogênio (*N uptake*) pelas plantas de milho em estágio vegetativo V3, V4, V5 e V6. Índice azul do balanço de nitrogênio (NBI_B); índice vermelho do balanço de nitrogênio (NBI_R); e índice de clorofila (CHL).

Para o experimento do potássio (expK) nenhum índice foi capaz de detectar a variabilidade do nutriente nos estádios vegetativos iniciais em que as amostras foram coletadas (entre V2 a V6). Isto porque possivelmente a quantidade requerida de potássio no estágio em que a biomassa foi colhida (V6) independe da quantidade aplicada, porém podendo demonstrar deficiência nutricional em estádios posteriores. Os índices utilizados são citados em literatura como uma possível ferramenta para detectar variabilidade de N em plantas (Cerovic et al., 2002; Tremblay et al., 2011; Longchamps and Khosla, 2014), no entanto para detectar variabilidade

de potássio estes índices demonstraram ineficazes, podendo haver algum outro índice mais apropriado para avaliar deficiência de K em plantas de milho.

Tabela 2. Precisão dos dados estimados (RMSE) e coeficiente de determinação (R^2) medidos pelo ganho de N (*N uptake*) em função de três diferentes índices de fluorescência.

	Ganho de nitrogênio (<i>N uptake</i>) em função de			DAE [†]	Estádio vegetativo	Data de medição
	NBI_B	CHL	NBI_R			
R^2	0.98	0.93	0.98	10	V2	12/11/2012
RSME	0.31	0.54	0.26			
R^2	0.98	0.96	0.97	18	V3	20/11/2012
RSME	0.30	0.40	0.35			
R^2	0.96	0.98	0.91	26	V4	28/11/2012
RSME	0.41	0.32	0.66			
R^2	0.99	0.86	0.99	35	V5	07/12/2012
RSME	0.18	0.76	0.10			
R^2	0.96	0.93	0.97	41	V6	13/12/2012
RSME	0.45	0.59	0.39			

[†] DAE: Dias após emergência.

^{††} Todas as curvas foram ajustadas com $p < 0.0001$

CONCLUSÃO

O uso de sensor de fluorescência foi eficiente em detectar deficiência de nitrogênio em milho em estádios vegetativos iniciais (V2 a V6). O índice NBI_B (índice azul de balanço de nitrogênio) foi o que obteve o melhor desempenho seguidos dos índices NBI_R (índice vermelho de balanço de nitrogênio) e CHL (índice de clorofila). Há uma correlação quadrática positiva entre o ganho de N na planta de milho e os três índices citados.

Não foi possível detectar variabilidade de potássio pelos índices de fluorescência analisados, mesmo que houve uma correlação positiva entre diferentes doses de K aplicadas na planta e o ganho de K. Estudos direcionados a índice de fluorescência para detectar variabilidade de potássio em tecidos clorofilados podem ajudar a dar início em pesquisas relacionadas ao assunto.

Os resultados obtidos com sensor de fluorescência em ambiente controlado para detectar variabilidade de N em plantas de milho em estádios iniciais são bastante promissores. O teste desta tecnologia para condições de campo seria o passo mais lógico para que podemos entender melhor se este equipamento pode ser um sensor adicional para detectar variabilidade de N em estádios vegetativos iniciais. Com isso poderíamos contribuir na gestão da variabilidade das lavouras em tempo real, e otimizar a eficiência do uso de nitrogênio na cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC) **Official Methods of Analysis**, 1990, 15th Edition.

BALIGAR, VC., N.K. FAGERIA, and Z.L. HE. 2001. **Nutrient use efficiency in plants**. *Communication Soil Science Plant Analysis*. 32:921-950.

BENDER, R.R., HAEGELE, J.W., RUFFO, J.G., and BELOW, F.E. 2013. **Modern corn hybrids' nutrient uptake patterns**, *Better crops* 97:7-10.

CARPENTER, S. R., CARACO, N. F., CORRELL, D. L., HOWARTH, R. W., SHARPLEY, A. N., & SMITH, V. H. (1998). **Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen**. *Ecological Applications*, 8, 559–568.

CASSMAN, K.G., A. DOBERMANN, and D.T. WALTERS. 2002. **Agroecosystems, nitrogen-use efficiency, and nitrogen management**. *Ambio* 31:132-140.

CEROVIC, Z.G., OUNIS, A., CARTELAT, A., LATOUCHE, G., GOULAS, Y., MEYER, S., MOYA, I., 2002. **The use of chlorophyll fluorescence excitation spectra for the non-destructive in situ assessment of UV-absorbing compounds in leaves**. *Plant, Cell & Environment* 25, 1663–1676.

Force-A. 2010, Multiplex3 user's guide. ftp://ftp.dynamax.com/manuals/Multiplex3_Manual.pdf (acessado em 16 de Agosto de 2014)

GUPTA, M. L., & KHOSLA, R. 2012. **Precision nitrogen management and global nitrogen use efficiency**. In *Proceedings of the 11th International Conference on Precision Agriculture*, Indianapolis, USA

HOAGLAND, D.R. and D.I. ARNON. 1950. **The water-culture method for growing plants without soil**. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347:1-32.

LONGCHAMPS, L. and R. KHOSLA. 2014. **Early detection of nitrogen variability in maize using fluorescence**. *Agronomy Journal*. 106(2)

MANGAN, M.E., SHEAFFER, C., WYSE D.L., EHLKE, N.J., and REICH, P.B. 2011. **Native perennial grassland species for bioenergy: Establishment and biomass productivity**. *Agron.J.* 103:509-519.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2012. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. www.R-project.org (accessed 04 March, 2014)

TREMBLAY, N., FALLON, E., ZIADI, N. 2011. **Sensing of crop nitrogen status: Opportunities, tools, limitations, and supporting information requirements**. *Horttechnology* 21:274-281