



"PERSPECTIVA NO MELHORAMENTO GENÉTICO VISANDO FIXAÇÃO BIOLÓGICA  
DE NITROGÊNIO EM MILHO (*Zea mays* L.)"

Altair Toledo Machado

= 1985 =

00778

## I. INTRODUÇÃO

A escassez de energia, registrada pelos constantes aumentos de preço do petróleo, a partir da década de setenta, concorreu para onerar em demasia, a produção industrial de fertilizantes nitrogenados. A crise mundial de alimentos também elevou os preços dos produtos agrícolas a níveis alarmantes. Por outro lado, o aumento da produtividade agrícola tem mostrado, principalmente nos países industrializados e no Oriente, uma correlação com o consumo de adubos nitrogenados.

Segundo estimativas de HARRIS & HARRE (1979), o consumo de nitrogênio em 1980, na América Latina, foi de  $2,7 \times 10^6$  toneladas, aproximadamente. Desta forma, a deterioração do meio ambiente e o abastecimento inadequado de alimentos em várias regiões do mundo poderiam ser atribuídos, em parte, ao uso indiscriminado de nitrogênio ou a sua falta, respectivamente.

A perda progressiva do nitrogênio no sistema solo/planta, principalmente em regiões tropicais, se dá de várias maneiras, como lavagens (lixiviação), remoção pelas colheitas, perdas por erosão, perdas pelo fogo, etc. Além disso, a intensificação do uso de adubos químicos e também da exploração agrícola, em geral, tem resultado numa carga muito pesada para o processo biológico que mantém o equilíbrio do nitrogênio na biosfera. A busca de alternativas que permitam a manutenção da fertilidade dos solos e o aumento da produtividade agrícola torna-se prioridade em todo o mundo.

A biosfera possui um grande número de organismos com habilidade em incorporar o nitrogênio atmosférico aos componentes metabólicos. Há sistemas fixadores extremamente evoluídos que têm sido utilizados há muitos anos a serviço da agricultura.

Segundo DOBEREINER & DUQUE (1980), a importância da fixação biológica de nitrogênio, pode ser ilustrado pelo exemplo da cultura da soja, onde, considerando-se as estimativas para 1980, isto é, 10 milhões de hectares cultivados com a

cultura da soja e uma produção aproximada de 15 milhões de toneladas de grãos, e considerando-se ainda os teores de proteína e de N no grão em torno de 40% e 6%, respectivamente, obtêm-se 900.000 toneladas de N, que são fixadas anualmente. Este mesmo cálculo pode ser feito para o milho, supondo uma produção de 25 milhões de toneladas de grãos (com uma produção média em torno de 2.200kg/ha) e com 10% e 1,5% de proteína e N no grão.

Como podemos observar, além da soja outras culturas poderão ser melhoradas valendo-se da fixação biológica do nitrogênio, onde dariam importantes economias ao país.

Além disso, as quantidades de nitrogênio, onde dariam importantes economias ao país, incorporadas no solo através da fixação biológica, poderão ser aumentadas. Basta que se apliquem os conhecimentos já disponíveis, fornecidos pela pesquisa, e que se incentivem as investigações sobre vários outros aspectos relacionados com fixação biológica e melhoramento genético dos cultivares, visando esses caracteres.

Cabe salientar, ainda, que apesar dos trabalhos relacionados com fixação do nitrogênio em milho, utilizando-se das técnicas de melhoramento genético serem realizadas a médio e a longo prazos, por outro lado permitem obter genótipos superiores na eficiência de absorção de nutrientes (principalmente nitrogênio) a curto prazo.

## II. FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM MILHO

Na ordem de importância mundial, a cultura do milho situa-se em 3º lugar, sendo sua maior relevância nos países em desenvolvimento.

O principal fator limitante para esse cultivo se refere quanto à disponibilidade de nutriente no solo. O nitrogênio representa um dos maiores problemas, pois seus teores em nossos solos são, freqüentemente, baixos.

A bactéria responsável pelas associações mais importantes foi identificada como *Azospirillum*, e segundo MAGALHÃES *et alii* (1979), infecta as raízes proliferando em espaços inter e intra-celulares e, principalmente nos protoxilemas, que podem ser completamente preenchidos com bactérias. Em regiões tropicais, essas bactérias ocorrem em grande abundância, números na faixa de  $10^6$  ou  $10^7$  de células de *Azospirillum* por g/raízes ou solo podem ser encontrados durante o ciclo vegetativo de milho e sorgo, segundo DOBEREINER (1977). Parece, portanto, que a fixação de nitrogênio ocorre principalmente na região da rizosfera para o interior das raízes.

Uma vez estabelecidas as associações de gramíneas e cereais com *Azospirillum*, foram iniciados trabalhos sobre a ecologia e fisiologia das associações para esclarecimento de seu mecanismo. Reclassificação das bactérias responsáveis com a criação de um novo gênero com duas espécies (*A. lipoferum* e *A. brasiliense*), foi necessária segundo TUTIM (1958). Estudos de fisiologia da bactéria revelaram numerosos fatos interessantes. Ambas as espécies podem dissimilar nitrato e nitrito, mas há estirpes que não reduzem nitrito a nitrogênio molecular. Com exceção deste grupo, as demais formas de *Azospirillum* são denitrificadores, isto é, além de fixarem nitrogênio, possuem o mecanismo para o processo oposto, que é a perda do nitrogênio mineral em forma gasosa.

Recentemente, ainda foi demonstrada especificidade hospedeira na associação das gramíneas, segundo BALDANI *et alii* (1980). Num solo uniformemente inoculado, raízes de milho foram infectadas apenas por *A. lipoferum*, enquanto trigo e arroz selecionaram para *A. brasiliense*.

Os conhecimentos recentes da especificidade hospedeira nas associações de *Azospirillum* levaram a resultados promissores. Esses resultados promissores, entretanto, não devem levar a mais uma onda precipitada de querer inocular indiscriminadamente. Ainda falta muito para se definir condições e bactérias apropriadas para cada situação.

Na Tabela I podemos observar características importantes para fixação de nitrogênio em simbiose planta/bactéria.

● *Planta*

1. Conversão eficiente da energia solar
2. Disponibilidade de excessos de produtos fotossintéticos
3. Formação de nódulos ou estruturas correspondentes que oferecem:
  - Proteção mecânica
  - Acesso rápido de oxigênio
  - Manutenção de concentrações baixas de oxigênio no sítio
  - Via específica de assimilação de amônia capaz de assimilar concentrações muito baixas

● *Bactéria*

1. Metabolismo oxidativo
2. Mecanismo de reconhecimento da planta hospede
3. Infecção das raízes e multiplicação interna
4. Fixação de  $N_2$  sem multiplicação de células
5. Excreção do  $NH_3$  fixado (deregulação da nitrogenase)
6. Mecanismos alternativos de proteção da nitrogenase contra oxigênio se a planta não os oferece.

Assim, os últimos 10 anos de pesquisas sobre fixação de nitrogênio em milho indicam as seguintes práticas para a sua exploração a curto prazo:

1. Maximização da fixação de nitrogênio espontânea pela utilização de fórmulas de adubação apropriadas, isto é, níveis baixos de N, altos de P e complementados com Mo;
2. Melhoramento de plantas para maior fixação de nitrogênio;
3. Inoculação com estirpes selecionadas de *Azospirillum* quando forem disponíveis;

4. Interações dos genótipos planta e bactéria e níveis baixos de  $\text{NO}_3$  precisam ser melhor explorados, pois representam a chave para a complementação de fixação de nitrogênio com N mineral em cereais e gramíneas forrageiras.

A fixação de nitrogênio em milho e em outras gramíneas tem sido o grande desafio da pesquisa no momento. Mesmo que apenas parte do nitrogênio possa ser fornecida pela associação com bactérias fixadoras deste elemento, a economia em adubos chegaria a proporções semelhantes às das leguminosas.

### III. MÉTODOS PARA AVALIAR A FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

#### (a) Técnica da diferença do N total e técnica da diluição isotópica de $\text{N}_{15}$

Uma técnica fácil para quantificação é a técnica da diferença do nitrogênio total, onde a avaliação da contribuição da fixação é calculada subtraindo-se o N total em uma planta não fixadora de  $\text{N}_2$  do N total da planta fixadora. A hipótese inerente ao uso desta técnica é a de que a planta fixadora e a planta não fixadora retiram as mesmas quantidades de nitrogênio no solo. Esta técnica é melhorada se nitrogênio marcado for adicionado ao solo, se a cultura-teste e a cultura-controle recuperam a mesma quantidade de nitrogênio marcado, então quase certamente, elas retiram do solo quantidades de N não marcado muito semelhante também.

Se a planta-controle e a planta-teste recuperam quantidades diferentes do N marcado e N não marcado do solo, então a técnica de diferença do N não pode ser usada, pode-se, porém, usar a técnica da diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ , cuja suposição é de que num solo onde foi adicionado nitrogênio marcado com  $^{15}\text{N}$ , a planta fixadora de  $\text{N}_2$  e a planta-controle tiram nitrogênio do solo com o mesmo enriquecimento (%  $^{15}\text{N}$ ).

Assim, supõe-se que a relação entre N marcado do fertilizante e o N não marcado absorvido do solo é a mesma para as duas plantas. A proporção de proveniente da fixação de  $\text{N}_2$  na planta fixadora pode ser calculada pela diluição proporcional do enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  no N proveniente do solo.

A técnica da diluição isotópica requer que as plantas-testes e controles retirem o N do solo com o mesmo enriquecimento de  $^{15}\text{N}$ . Para isso, é necessário que o solo seja uniformemente marcado no tempo e na profundidade, mesmo que as plantas retirem quantidades diferentes de N com o tempo ou explorou o solo em profundidades diferentes, as duas plantas ainda recuperarão N do solo com o mesmo enriquecimento de N marcado ( $^{15}\text{N}$ ) e a técnica da diluição isotópica poderá ser usada.

A técnica do N marcado, sem dúvida, é a que se pode ter maior confiabilidade, mas devido ao seu alto custo, esta técnica deve ser usada apenas em estágios bem desenvolvidos, uma técnica mais simples e mais econômica e, por essa razão, a mais usada no momento é a técnica de redução de acetileno, que apesar de dar resultados mais grosseiros é extremamente prática em início de programa.

#### (b) Técnica de redução de acetileno

##### (b.1.) Nitrogenase

A nitrogenase é o complexo enzimático universalmente responsável pela redução biológica do nitrogênio atmosférico em amônia. Estudando substratos alternativos para essa enzima, DILWORTH (1966) e SCHOLLORN & BURRIS (1966), descobriram que o acetileno inibe a redução do  $\text{N}_2$  pela nitrogenase ( $\text{N}_2$ -ase) e que o acetileno ( $\text{C}_2\text{H}_2$ ) é reduzido a etileno ( $\text{C}_2\text{H}_4$ ). HARDY & KNIGHT (1967), sugeriram, então, que essa reação poderia permitir uma nova técnica para a medição da atividade da  $\text{N}_2$ -ase.

A reação normalmente catalizada pela  $\text{N}_2$ -ase "in vivo" é:



Se a  $\text{N}_2$ -ase é exposta ao acetileno na ausência de  $\text{N}_2$ , essa reação é substituída por:



HARDY & KNIGHT (1966) descobriram que o consumo de ATP da  $\text{N}_2$ -ase é independente do substrato que está sendo reduzido.

## (b.2.) Vantagens da técnica da redução de acetileno

A maior vantagem da técnica de redução de acetileno é a sua grande sensibilidade e velocidade quando comparada com outras técnicas existentes.

## (b.3.) Aplicações da técnica de redução de acetileno

### (b.3.1.) Pressão parcial do acetileno

É necessário expor o sistema de fixação de  $N_2$  a uma concentração de  $C_2H_2$  suficiente para saturar a enzima e obter a máxima atividade de redução de acetileno. Uma pressão parcial de  $C_2H_2$  de 0.025 e 0.010 atm ( $25\text{m}\ell.l^{-1}$  até  $100\text{m}\ell.l^{-1}$  à pressão normal da atmosfera) é usualmente suficiente para obter-se a máxima taxa de produção de  $C_2H_4$  (HARDY *et alii*, 1968).

### (b.3.2.) Sistemas em milho

Os melhores métodos para estimar a redução de acetileno associada com gramíneas e cereais são: o uso da análise em cilindros intactos com grande cuidado para evitar perturbar o solo nos cilindros, ou a análise completamente "in situ".

Para a elaboração da análise "soil core", cilindro do solo, nós recomendamos que a planta seja semeada dentro do cilindro ou que o cilindro seja enterrado no solo em torno da planta pelo menos uma semana antes da análise. Os cilindros devem ter dimensões suficientes para que os danos ao sistema radicular sejam mínimos; para milho e sorgo utilizam-se cilindros de 18cm de diâmetro por 18cm de altura. 24 horas antes da análise, o interior do cilindro é coberto com 2 a 3cm de areia seca para prevenir a atividade de algas. Para a análise, o cilindro mais o sistema solo-planta são fechados e acetileno é injetado dentro do recipiente através da "suba seal", de modo que a atmosfera contenha 100 a 150mℓ/ℓ de acetileno volume do recipiente e se esse volume não é conhecido, é preciso que um padrão interno (10mℓ de propano) seja injetado. O período de incubação não deve ser longo. WANI *et alii* (1983) recomenda que a amostra inicial deve ser tirada depois de 1 hora, quando os

gases do sistema estão equilibrados e a amostra final 5 horas mais tarde. Esse método é feito com as plantas em vaso e onde exista uma tampa que possa ser fechada para a análise, a planta não precisa ser perturbada durante todo o tempo da análise, o que é uma grande vantagem mas rigorosas precauções devem ser tomadas para o controle de algas, já que estas plantas frequentemente crescem em condições de umidade na casa de vegetação.

Para a análise "in situ" de plantas de terras secas, recomenda-se similarmente que as plantas devem ser semeadas nos cilindros ou estes enterrados pelo menos uma semana antes da amostragem. Como antes, areia deve ser adicionada para o controle de algas. Para a análise, nesse caso, é necessário o uso de um saco plástico de diâmetro levemente maior que o cilindro. Polipropileno é menos permeável aos gases do que polietileno e por isso, sacos finos desse material servem bem.

#### IV. MELHORAMENTO GENÉTICO VISANDO FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM MILHO

- Adaptação dos métodos tradicionais, por mim proposto, visando esse trabalho.

##### 1. Avaliação de um amplo germoplasma

No início do programa, é necessário fazer uma avaliação em ensaios de produtividade, de um amplo germoplasma constituído por variedades, compostos e populações no sentido de se definir quais materiais serão trabalhados para os caracteres em questão. Um dos esquemas aconselhados é subdividir as parcelas do ensaio com adubação nitrogenada e sem adubação nitrogenada nas subparcelas, avaliando, com isso, a depreciação dos tratamentos do nível com adubação para o nível sem adubação. Como técnicas auxiliares, que servirão de subsídios na escolha dos melhores cultivares, poderão ser feitas análises do N total do grão (amostragem de cada subparcela), e da redução de acetileno no estágio de "seedling".

## 2. Seleção entre e dentro família de meios irmãos

O método consiste no seguinte: inicialmente são obtidas espigas de polinização livre da população a ser melhorada, as espigas de cada planta constituem uma sã progênie de meios irmãos. As espigas são debulhadas e as sementes de cada progênie são colocadas em sacos separados. As progênies são avaliadas em ensaios de produção com baixa quantidade de nitrogênio, onde todos os caracteres de interesse são anotados. Usualmente, de 200 a 500 progênies são avaliadas e o esquema de redução de acetileno é feito "in situ", auxiliando em conjunto com as avaliações agronômicas, na escolha das melhores progênies para fixação de nitrogênio; após isso pratica-se uma seleção na ordem de 10 a 20% e esta etapa constitui a seleção entre progênies. As melhores progênies assim selecionadas são recombinadas entre si na geração seguinte, usando as sementes remanescentes. Um procedimento adequado consiste em plantar um lote isolado de despendoamento, onde as progênies selecionadas constituirão as fileiras femininas e as masculinas serão plantadas com uma mistura de todas as progênies selecionadas. Esse lote pode ser plantado em um tanque de aproximadamente 400m<sup>2</sup>, onde o N marcado foi incorporado junto à matéria orgânica, permitindo, com isso, a utilização da técnica da diluição isotópica do <sup>15</sup>N, que em conjunto com as observações agronômicas nos permitirá escolher, dentro de cada fileira feminina, as melhores plantas; essa etapa constitui a seleção dentro das progênies.

## 3. Seleção entre e dentro família de irmãos germanos

Segue o esquema anterior, com exceção da obtenção de progênies, onde obtêm-se cruzando manualmente as plantas; assim 200 progênies de irmãos germanos são obtidos de 400 plantas da população.

## 4. Seleção entre e dentro de famílias endogâmicas S<sub>1</sub> ou S<sub>2</sub>

Nesse caso, as progênies são obtidas por autofecundação e a obtenção de progênies endogâmicas faz com que aumente a variância entre as progênies e aumente

a uniformidade das plantas dentro das progênes e isso parece ser interessante quando se quer auxiliar a seleção para fixação de nitrogênio, usando a técnica de redução de acetileno em vasos, onde um número pequeno de plantas das progênes são utilizadas.

#### 5. Seleção recorrente para capacidade de combinação geral

O método consiste em autofecundar um bom número de plantas numa população heterogênea, cruzando estas plantas autofecundadas com um testador de base genética ampla, que pode ser uma variedade ou um híbrido, a seguir são conduzidos ensaios comparativos de produção, sendo que os melhores genótipos reconhecidos são intercruzados entre si para se obter o 1º ciclo. A técnica da redução de acetileno, nesse caso, pode ser feito tanto em vasos como "in situ".

#### 6. Seleção recorrente para capacidade específica de combinação

Esse esquema é semelhante ao anterior, com exceção na utilização do testador, sendo esse de base genética restrita, uma linhagem autofecundada e de preferência com boa capacidade de fixação de nitrogênio.

#### 7. Seleção recorrente recíproca com família de meios irmãos

Esse esquema de seleção é utilizado quando se quer melhorar duas populações ao mesmo tempo; o método pode ser conduzido de modo que um ciclo é completado em três anos; outra variação desse método pode ser feita, utilizando-se plantas prolíficas e/ou famílias de irmãos germanos.

#### 8. Melhoramento de linhagens e exploração do vigor de híbrido

A obtenção de linhagens homozigóticas, parece ser um bom caminho no sentido de se obter informações sobre linhagens com capacidade de fixação de nitrogênio, e trabalhando-se com materiais homogêneos minimizam um pouco do problema de oscilação genética e permitem explorar o vigor do híbrido, através de cruzamentos,

atendendo, com isso, o mercado com materiais de alto potencial produtivo e com boa capacidade de fixação de nitrogênio.

Outros métodos, como seleção massal, espiga por fileira e seleção recorrente fenotípica, parecem não ser adequados ao trabalho em questão. O método do retrocruzamento pode ser utilizado futuramente.

O esquema de plantio em vasos, para a utilização da técnica de redução de acetileno, aconselho que seja plantado em cada vaso um mínimo de 3 sementes de milho para que o efeito da concorrência esteja presente. Cada vaso corresponde a uma parcela que deverá ser repetido um mínimo de 4 vezes. Esse esquema deve ser usado apenas como uma ferramenta auxiliar na escolha de progênies ou linhagens, onde estão sendo avaliadas normalmente no campo. Esse esquema pode ser utilizado na avaliação de progênies, onde dois ensaios são realizados: um no campo com baixa adubação nitrogenada utilizando-se um índice de seleção de 10% e outro utilizando esse esquema de plantio em vasos com as mesmas progênies e com 10% de índice de seleção, une-se as progênies selecionadas desses 2 ensaios e após a recombinação, pratica-se a seleção dentro de cada progênie (utilizando, nessa última fase, a técnica de diluição isotópica de nitrogênio como método auxiliar).

## V. CONCLUSÕES

A fixação de nitrogênio em milho é, sem dúvida, um grande desafio da pesquisa no momento. Existem boas perspectivas de se obter sucesso, onde resultados observados, em uma avaliação preliminar de um amplo germoplasma, realizados no ano agrícola 84/85, por mim em conjunto com o Prof. Paterniani e a Dra. Dobereiner, e equipe, mostrou-nos dados bastante animadores e que devem ser melhor explorados, permitindo, ainda, a idealização dessa monografia para linhas de pesquisa visando a fixação e/ou eficiência de nitrogênio, por mim realizadas, mas muito trabalho ainda está para ser feito, fazendo-se necessário a interligação multidisciplinar para que se possa ter, a médio prazo, resultados satisfatórios. Trabalhos de genética

molecular, no sentido de se obter boas estirpes de *Azospirillum*, trabalhos de solos, de fixação biológica e de melhoramento estão ainda em um estágio primário e as técnicas disponíveis para a determinação de fixação de nitrogênio não são ainda as mais adequadas; mas somando-se os esforços, grandes resultados poderão ser obtidos, gerando, com isso, uma grande economia de divisas ao país e barateando o custo de lavoura para o agricultor, sem contar na grande contribuição para a agricultura biológica do Brasil e o desenvolvimento científico e tecnológico que este tipo de trabalho trará para o nosso país.

#### VI. LITERATURA CITADA

1. BALDANI, V.L.D. & DOBEREINER, J. 1980. Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biol. Biochem.*, 12: 433-439.
2. DOBEREINER, J. 1977. Potential for nitrogen fixation in tropical legumes and grasses. In: Dobereiner, J.; Burris, R.H. & Hollaender, A. *Org. Limitations and Potentials for biological nitrogen fixation in the tropics Basic Life Sciences*, 10: 13-24, Nova York and Londres. Plenum Press.
3. HARDY, R.W.F. & KNIGHT, E.Jr. 1966. Reductant-dependent adenosine triphosphate of nitrogen fixing extracts of *Azotobacter vinelandii*. *Biochim. Biophys. Acta* 132: 520-531.
4. HARDY, R.W.F. & KNIGHT, E.Jr. 1967. ATP-dependent reduction of azide and HCN by  $N_2$ -fixing enzymes of *Azotobacter vinelandii* and *Clostridium pasterianum*. *Biochim. Biophys. Acta* 139: 69-90.
5. HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K. & BURNS, R.C. 1968. The acetylene-ethylene assay for  $N_2$ -fixation: Laboratory and field evaluations. *Pl. Physiol.* 43: 1185-1207.



6. MAGALHÃES, F.M.M.; PATRIQUIN, D. & DOBEREINER, J. 1979. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. Rev. Bras. Biol., 39: 587-596.
7. NOHRSTEDT, H.O. 1983. Natural formation of ethylene in forest soil and methods to correct results given by the acetylene reduction assay. Soil Biol. Biochem. 15 (3): 281-286.
8. NOHRSTEDT, H.O. 1984. Carbon monoxide as an inhibitor of  $N_2$ ase activity ( $C_2H_2$ ) in control measurements of endogenous formation of ethylene by forest soils. Soil Biol. Biochem. 16 (1): 19-22.
9. SPIFF, E.D. & ODU, C.T.I. 1973. Acetylene reduction by *Beijerinckia* under various partial pressures of oxygen and acetylene. J. Gen. Microbiol. 78: 207-209.
10. TUTIN, T.G. 1958. Classification of the legumes. In: Hallsworth, E.G. org Nutrition of the legumes. Nova York, Academic Press, p. 3-14.
11. WANI, S.P.; DART, P.J. & UPADHYAYA, M.N. 1983. Factors affecting nitrogenase activity ( $C_2H_2$  reduction) associated with sorghum and millet estimated using the soil core assay. Can. J. Microbiol. 29: 1063-1069.
12. WANI, S.P.; UPADHYAYA, M.N. & DART, P.J. 1984. An intact-plant assay technique for estimating nitrogenase ( $C_2H_2$  reduction) activity of sorghum and millet plants grown in pots. Pl. Soil (In Press).