

# EFEITO DA ADUBAÇÃO NITROGENADA E DA INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NO COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO DA CULTIVAR DE MILHO NITROFLINT<sup>1</sup>

ALTAIR TOLEDO MACHADO, LADASLAV SODEK<sup>2</sup>, JOHANNA DÖBEREINER e VERÔNICA MASSENA REIS<sup>3</sup>

RESUMO - Com o objetivo de verificar o efeito da adubação nitrogenada e da inoculação de bactérias diazotróficas no comportamento genético e bioquímico da cultivar de milho (*Zea mays* L.) Nitroflint, foram realizados dois experimentos; o primeiro no campo e o segundo em casa de vegetação. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com três repetições e dois fatores de avaliação: inoculação de bactérias diazotróficas (com e sem) e adubação nitrogenada (100 kg/ha de N e 10 kg/ha de N). No primeiro experimento, os caracteres avaliados foram: produção de grãos, nitrogênio total acumulado na planta (parte aérea) e no grão, atividade das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase. No segundo, avaliou-se o peso da planta (peso fresco) e a atividade das enzimas glutamina sintetase pelo método da transferase e sintetase, e nitrato redutase, determinada na folha e na raiz. Também foi realizada a contagem das bactérias diazotróficas na parte aérea e na raiz em três meios de cultivo: LGI (semi-seletivo para *Azospirillum amazonense*), JNFb (*Herbaspirillum* spp.) e NFb (*Azospirillum* spp.). Os resultados do primeiro experimento mostraram efeito da adubação nitrogenada no nitrogênio total e produção de grãos. No segundo experimento houve efeito da adubação em todos os caracteres avaliados e a inoculação apresentou efeito na atividade da enzima glutamina sintetase na raiz a partir da reação da transferase. Houve correlação da atividade da glutamina sintetase na raiz com o crescimento bacteriano no meio LGI.

Termos para indexação: *Zea mays*, absorção de nitrogênio, utilização de nitrogênio, glutamina sintetase, nitrato redutase.

## EVALUATION OF NITROGEN FERTILIZER AND INOCULATION WITH DIAZOTROPHIC BACTERIA ON THE BIOCHEMICAL BEHAVIOR OF THE MAIZE CULTIVAR NITROFLINT

ABSTRACT - The evaluation of nitrogen fertilizer and inoculation with diazotrophic bacteria on the genetic and biochemical behavior of the maize (*Zea mays* L.) cultivar Nitroflint were performed in two experiments, one in the field and the other in greenhouse. The experimental set up consisted of a randomized blocks design with three replications and two evaluation factors, inoculation (or not) with diazotrophic bacteria and nitrogen fertilizer levels (100 kg/ha of N and 10 kg/ha of N). In the field experiment the following parameters were measured: grain production, total plant nitrogen (above ground), grain nitrogen and activities of the enzymes nitrate reductase and glutamine synthetase. In the second experiment (greenhouse), fresh weight of the plant, glutamine synthetase (transferase and synthetase) and nitrate reductase activities were determined for both leaf and root tissue. A bacterial count was made in three media, denominated LGI (semi-selective for *Azospirillum amazonense*), JNFb (*Herbaspirillum* spp.) and NFb (*Azospirillum* spp.) for the shoot and the root. Results of the field experiment showed an effect of N fertilizer on total N and grain production. The second experiment (greenhouse) showed an effect of N fertilizer on all parameters measured and inoculation was effective on glutamine synthetase activity of the root by transferase reaction. A correlation was obtained between root glutamine synthetase activity and bacterial growth in LGI.

Index terms: *Zea mays*, uptake of nitrogen, utilization of nitrogen, glutamine synthetase, nitrate reductase.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 18 de fevereiro de 1998.

Extraído da Tese de Doutorado apresentada pelo primeiro autor à UFRJ.

<sup>2</sup> Bioquímico, Ph.D., Prof. Titular, Dep. Fisiologia Vegetal, UNICAMP, CEP 13083-970 Campinas, SP. E-mail: lsodek@turing.unicamp.br

<sup>3</sup> Eng<sup>a</sup>. Agr<sup>a</sup>, Ph.D., Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB), km 47 Antiga Rio São Paulo, Caixa Postal 74505 CEP 23851-970 Seropédica, RJ. E-mail: agrob@cnpas.embrapa.br

## INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas de maior importância no país, não só pela extensão da área cultivada, mas por sua diversidade de utilização, em que se destacam a alimentação animal e humana, e por seus reflexos sócio-econômicos.

O nitrogênio (N) representa papel fundamental por sua atuação decisiva no metabolismo das plantas, notadamente na síntese de proteínas. Considerado o nutriente mais importante tanto no incremento da produção de grãos como na elevação do teor protéico destes, é também o elemento que mais onera a cultura. Estima-se que os fertilizantes nitrogenados representem 75% dos custos, o que corresponde a 40% do custo total da produção da cultura. Além disso, os fertilizantes nitrogenados são a maior fonte de poluição ambiental dos sistemas agrícolas (Machado & Magnavaca, 1991).

Assim, a otimização da produtividade de grãos depende, entre outros fatores, da eficiência de canalização de C e N para o grão e da transformação desses elementos em compostos de reserva. Aumentar a eficiência por meio da manipulação desses processos pode ser um meio de melhorar a produtividade no futuro. No momento, ainda é necessário conhecer melhor os mecanismos genéticos e bioquímicos de tais processos (Sodek, 1989). Entretanto, os caminhos para se obter genótipos eficientes na utilização do N são bastante complexos, pois o metabolismo do N é influenciado por diversos fatores ambientais (Machado & Magnavaca, 1991) e parece não haver dúvida de que essas condições de estresses agem diretamente sobre a atividade das enzimas do metabolismo do N e provavelmente com o catabolismo de aminoácidos, proteínas e outros compostos nitrogenados. Assim, o incremento da atividade de enzimas do metabolismo do N pode ser importante em programas de seleção que visam à eficiência no uso do N (Machado et al., 1992; Machado & Magalhães, 1995; Magalhães & Machado, 1995).

Bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> do gênero *Azospirillum* (Döbereiner & Day, 1976; Baldani & Döbereiner, 1980) e *Herbaspirillum* (Olivares et al., 1996) foram isoladas de folhas, colmos e principalmente de raízes de diversas gramíneas. Vários trabalhos foram realizados usando bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> em milho, cuja maioria usou a inoculação de *A. brasiliense* (Okon, 1985; Jagnow, 1987; Sarig et al., 1988). Recentemente, Salomone & Döbereiner (1996) observaram diferenças significativas na atividade da redutase do nitrato em genótipos de milho submetidas à inoculação de uma mistura de estirpes de *Azospirillum*. O efeito benéfico da inoculação também pode estar relacionado com a estirpe inoculada, em que estirpes isoladas da mesma planta apresentaram melhores resultados em alguns experimentos (Döbereiner & Baldani, 1982; Reynders & Vlassak 1982; Boddey et al., 1986). Porém, poucos estudos foram feitos para identificar os mecanismos da interação entre essas bactérias e as enzimas do metabolismo do N em milho. Sem dúvida, esse também é um caminho a ser seguido com grande potencial para se obter genótipos de milho eficientes na absorção e utilização do nitrogênio.

O presente trabalho teve por objetivos conhecer o comportamento das enzimas glutamina sintetase e nitrato redutase e a contribuição de bactérias diazotróficas no genótipo de milho Nitroflint, em alto e baixo nível de adubação nitrogenada, e verificar a possível contribuição desses parâmetros de avaliação em programas de seleção genética que visam a maior eficiência na absorção e utilização do nitrogênio.

## MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foi utilizada a variedade denominada Nitroflint, que sofreu três ciclos de seleção massal e um ciclo de seleção entre e dentro de famílias de irmãos germanos para eficiência no uso do nitrogênio. É uma variedade de grãos duros e semiduros, alaranjados, com segregação para branco e predomínio dos germoplasmas cateto, eto e duros do caribe, formado a partir de 36 populações da América Central e América do Sul.

A variedade Nitroflint foi avaliada em dois experimentos, o primeiro no campo e o segundo em casa de vegetação. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com três repetições e dois fatores de avaliação, inoculação de bactérias diazotróficas (com e sem) e adubação nitrogenada (alto e baixo nível de N). O primeiro ensaio foi instalado no campo experimental da Embrapa-CNPAB, em um solo Podzólico Vermelho-Amarelo distrófico série Itaguaí, no ano agrícola de 1994. A parcela experimental foi constituída de uma fileira de 2,5 metros, espaçadas entre si por um metro. Após o desbaste, o stand final foi de 12 plantas/parcela e cada repetição foi constituída de quatro parcelas, com tratamentos diferenciados, na seguinte ordem: 1) inoculação de uma mistura de bactérias diazotróficas e baixo nível de adubação nitrogenada (10 kg N/ha); 2) inoculação e alto nível de adubação nitrogenada (100 kg N/ha); 3) sem inoculação e baixo nível de adubação nitrogenada; 4) sem inoculação e alto nível de adubação nitrogenada. O ensaio foi uniformizado com adubação de fósforo e potássio, segundo as recomendações para o Estado do Rio de Janeiro (Almeida et al., 1988) e de acordo com a análise do solo efetuada. Utilizou-se uréia como fonte de N, aplicada em duas épocas nas parcelas com

alto nível de N (1/3 no plantio e 2/3 aos 45 dias após o plantio), e em uma época nas parcelas com baixo nível de N (todo no plantio). A inoculação foi realizada no plantio, colocando-se 0,5 grama de inoculante por semente.

Foram anotados os seguintes caracteres: 1) número de plantas (anotados para correção de stand); 2) peso de grãos, transformados em toneladas por hectare; 3) percentagem de umidade dos grãos; 4) atividade das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase ( $\mu\text{mol/h/g}$  tecido fresco); e 5) N total da planta e dos grãos ( $\text{kg N/ha}$ ).

A determinação da atividade enzimática foi realizada aos 60 dias após o plantio na parte central da folha superior e oposta à inserção da espiga superior. Após a colheita e secagem do material foi determinado o N total da planta e dos grãos, utilizando-se amostras de 5 plantas por parcela.

O segundo experimento foi realizado em casa de vegetação no Departamento de Fisiologia Vegetal da Unicamp em 1995. Adotaram-se os mesmos procedimentos realizados no primeiro experimento (parcelas experimentais com quatro tratamentos conforme descrito anteriormente, blocos ao acaso e três repetições). As plantas foram crescidas em vasos de 5 litros com vermiculita, onde foram cultivadas inicialmente 10 plantas por vaso da variedade Nitroflint. A inoculação foi efetuada no plantio, colocando-se 0,5 gramas de inoculante por semente. Após 12 dias do plantio, foi feito o desbaste, permanecendo 4 plantas sadias por vaso e a seguir foi iniciada a irrigação com solução nutritiva. Foram aplicados 250 mL de solução duas vezes por semana, e diariamente, os pratos sob os vasos foram completados com água. A coleta dos dados foi iniciada entre 21 e 25 dias após o plantio. Foram anotados os seguintes caracteres: atividade das enzimas glutamina sintetase (reação da transferase e sintetase) e redutase do nitrato, peso da matéria fresca e contagem de bactérias diazotróficas.

Dois soluções de Hoagland modificadas (pH médio de 5,1 - Hoagland & Arnon, 1951) foram usadas para dois regimes de N (100%  $\text{NO}_3$  e 10%  $\text{NO}_3$ ). A partir do preparo de soluções estoque, foram feitas duas soluções diluídas 1:1: solução I com 100% de N na forma de  $\text{NO}_3$  e solução II, com todos os nutrientes menos o nitrogênio. Nas Tabelas 1 e 2, encontram-se as concentrações e as formas de cada nutriente utilizadas na solução nutritiva para os dois regimes de nitrogênio.

**TABELA 1. Composição das soluções nutritivas I (100%  $\text{NO}_3$ ) e II (sem N).**

Nutriente	Solução I      Solução II	
	----- (mg/L) -----	
$\text{Ca}(\text{NO}_3) \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1180	—
$\text{KNO}_3$	505	—
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	136	136
$\text{MgSO}_4$	492	492
$\text{K}_2\text{SO}_4$	—	348
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	—	344
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	24,1	24,1
EDTA	25,1	25,1
$\text{H}_3\text{BO}_3$	2,04	2,04
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2,34	2,34
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,88	0,88
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,20	0,20
$\text{Na}_2 \text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,26	0,26

#### **Determinação do teor e conteúdo de nitrogênio**

Os teores de N foram obtidos pela digestão por balão Kjeldahl, destilação e titulação, como descrito por Bremner & Mulvaney (1982), o conteúdo de N foi determinado na parte aérea e nos grãos, a partir do produto de N (%) pelo peso seco (g), sendo o resultado apresentado em gramas, feitas as devidas transformações de unidades.

#### **Determinação da atividade da enzima nitrato redutase**

O método para estimar a atividade da nitrato redutase (NR) *in vivo* foi descrito por Reed et al. (1980). Ele consiste em infiltrar o tecido com uma solução contendo nitrato e na subsequente dosagem do nitrito produzido na reação que se difunde para o meio de incubação.

**TABELA 2. Concentração dos nutrientes utilizados a partir da solução I (100% NO<sub>3</sub>) e II (sem N).**

Nutriente	Solução I	Solução II
	----- (mg/L) -----	
N-NO <sub>3</sub>	210,00	0,00
Ca	200,00	180,00
K	234,00	195,00
P	31,00	31,00
Mg	48,00	48,00
S	64,00	128,00
Fe	4,85	4,85
Mn	0,67	0,67
B	0,36	0,36
Zn	0,20	0,20
Cu	0,05	0,05
Mo	0,11	0,11

Para a determinação dos ensaios de campo foram cortados pedaços de folhas de cinco plantas competitivas, acima e inverso da espiga superior, local de maior atividade da NR (Reed et al., 1980). Para o ensaio de casa de vegetação foram cortados pedaços da terceira folha desenvolvida de cima para baixo. Os pedaços cortados foram de aproximadamente 10 x 10 mm e após homogeneização ficou-se com 400 mg. O material foi coletado sempre entre 10 e 12 horas, período em que as plantas receberam pelo menos 3 horas de sol e a NR já tinha atingido sua atividade máxima (Reed et al., 1980; Lillo, 1984) e entre 55 e 60 dias após o plantio no ensaio de campo e entre 22 e 25 dias nos ensaios de casa de vegetação.

Após a coleta e pesagem do tecido vegetal, ele foi introduzido em recipientes de vidro de 30 mm de diâmetro por 60 mm de altura, contendo meio de infiltração na proporção de 1:10 (p/v). O meio de infiltração consistiu de 0,1M de tampão fosfato pH 7,5, 1% de n-propanol e 0,1M de nitrato de potássio. Foi introduzido no frasco um suporte de plástico revestido com tela de nylon para manter os pedaços de tecidos submersos na solução. A seguir, os frascos foram colocados sob vácuo de aproximadamente 5 mm de mercúrio. Decorridos 2 minutos, o ar foi rapidamente introduzido e esse procedimento repetido. Após a liberação do vácuo, os frascos foram incubados em banho-maria a 32°C e mantidos sob agitação constante. Durante a reação, mantiveram-se os frascos no escuro para evitar a utilização do nitrito formado na reação catalisada pela enzima nitrato redutase.

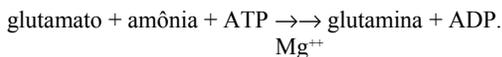
Em intervalos de 10 e 40 minutos, foi removida uma alíquota de 0,2 mL do meio de reação e colocada num tubo contendo 1,8 mL de água destilada, 1,0 mL de 1% (p/v) de sulfanilamida em HCl 1,5 N e 1,0 mL de 0,02% (p/v) de N-(1-naftil) etilenodiamino di cloreto. A quantidade de nitrito produzida foi determinada colorimetricamente, pela leitura da absorbância das soluções a 540 nm. A quantidade de nitrito foi calculada utilizando-se uma reta padrão na faixa de concentração de 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-1</sup> μmol de NO<sub>2</sub>. A atividade foi referida em micromoles de nitrito formado por hora, por grama de matéria fresca (μmoles NO<sub>2</sub> /h/g de MF).

#### **Determinação da atividade da glutamina sintetase**

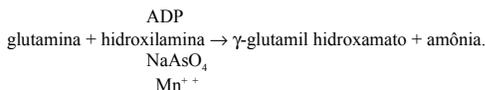
A obtenção do tecido foliar para a análise foi realizada conforme procedimento da nitrato redutase tanto nas condições de campo como nas de casa de vegetação. Após homogeneização dos tecidos ficou-se com 0,5 g. Esse material foi macerado em graal com pistilo (previamente resfriado) e homogeneizado em meio de extração 1:10 (p/v), à temperatura de 0 a 4°C, em banho de gelo. O material foi sempre mantido a baixa temperatura (em torno de 0°C). O meio de extração consistiu de 0,1M de tampão imidazol-HCl, pH 7,8, acrescido de DTT (ditiotreitól) 1 mM. Utilizou-se 0,3 mL de meio de extração por 0,5 g de tecido verde ou de raízes previamente lavadas em água destilada e enxugadas em papel absorvente. Após a maceração com o meio de extração, o produto final foi filtrado em gaze, em becker de 50 mL e transferido para tubos de centrifuga mantidos em caixas de isopor com gelo. O homogeneizado assim obtido foi centrifugado a 15.000 g

durante 15 minutos a 2°C. O sobrenadante foi separado, e alíquotas de 1 mL foram dessanilizadas em colunas de Sephadex G-25 (1,5 x 12 cm) equilibradas previamente com o tampão de extração. A fração protéica coletada (2 mL) foi utilizada para avaliação da atividade enzimática (método da sintetase). Para o método da transferase foi retirada alíquota diretamente do sobrenadante sem passar pela coluna.

Na avaliação da atividade da glutamina sintetase utilizou-se o método descrito por Rhodes et al. (1975). A atividade pode ser medida pela reação sintetase dosando-se a formação de  $\gamma$ -glutamil hidroxamato a partir de glutamato e hidroxilamina (que substitui amônia), de acordo com a reação:



A reação transferase, que é o inverso da reação sintetase, é outro modo pelo qual pode ser avaliada a glutamina sintetase. Nesta reação, a enzima é incubada com glutamina e hidroxilamina, dosando-se a formação de  $\gamma$ -glutamil hidroxamato:



O meio de reação utilizado para avaliar a atividade da enzima pela reação da sintetase foi 500 mM de glutamato, 60 mM de hidroxilamina, 200 mM de  $\text{MgSO}_4$ , 80 mM de ATP e 50 mM de tampão imidazol pH 7,4. Para a reação da transferase foi utilizado meio de reação contendo 65 mM de glutamina, 17 mM de hidroxilamina, 33 mM de arseniato de sódio, 4 mM de  $\text{MnCl}_2$ , 1,7 mM de ADP e 100 mM de tampão imidazol, pH 6,8.

Os tubos de reação foram colocados em banho-maria, a 32°C, e a reação foi iniciada com a adição da enzima (0,2 mL), sendo o volume final de 1 mL. Após 30 minutos, a reação foi paralisada colocando-se 1 mL do reagente de Ferguson & Sims (1971), contendo 0,67 N de HCl, 0,20 de ácido tricloroacético e 0,37 M de  $\text{FeCl}_3$ . Com tal procedimento a reação foi paralisada e obteve-se a formação do composto responsável pela coloração do ensaio. As amostras foram então centrifugadas a 1.500 g durante 3 minutos com a consequente remoção das proteínas precipitadas. A seguir foi avaliada a quantidade de glutamyl hidroxamato formada, em espectrofotômetro, usando comprimento de onda de 535 nm para as leituras de absorbância. O resultado foi expresso em  $\mu$ moles do produto formado por hora e por grama de tecido, levando-se em consideração que 1  $\mu$ mol de glutamyl hidroxamato nas condições de ensaio mostra uma absorbância de 0,34 (Mori, 1981).

### Inoculação de bactérias diazotróficas e contagem dos microorganismos

Foram utilizadas 4 estirpes de bactérias diazotróficas. O inoculante foi preparado usando culturas crescidas por 48 horas em diferentes meios de acordo com a espécie, LGI (*Am76-A. amazonense*); JNFb (HS136-*Herbaspirillum seropedicae*) e NFb (S82 e CMS22-*A. lipoferum*). A descrição dos meios é detalhada por Döbereiner et al. (1995). Após o crescimento, as bactérias foram centrifugadas a 10 rpm por 10 minutos e cada pellet foi ressuspenso em 50 mL de meio NFb e misturados. O inoculante foi preparado com turfa moída estéril neutralizada com carbonato de cálcio e esterilizada duas vezes a 121°C, em autoclave com intervalo de 24 horas, à proporção de 50 mL de cultura para 150 g de turfa. A contagem do inoculante foi feita até 10<sup>6</sup>, ocorrendo crescimento acentuado até a diluição.

A contagem dos microorganismos na raiz e parte aérea do milho foi realizado usando o método do número mais provável (Döbereiner et al., 1995).

### Procedimentos estatísticos

Os ensaios foram analisados como blocos ao acaso com dois fatores (adubação nitrogenada e inoculação com mistura de bactérias diazotróficas). Os procedimentos estatísticos constaram de análise de variância, com aplicação do teste F para verificar a significância com 5 e 1% de probabilidade. Quanto aos valores médios dos caracteres estudados foi aplicado o DMS (diferença mínima significativa) e também realizado estudo de correlação entre alguns caracteres de interesse usando-se o teste T.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aspecto importante do uso auto-sustentável do N refere-se à fixação biológica do nitrogênio. Döbereiner & Salomone (1995) fizeram uma ampla revisão sobre o assunto e indicaram a possibilidade de se utilizar a fixação biológica como critério de seleção em genótipos de milho visando à eficiência no uso de N, e apontaram respostas à inoculação de bactérias diazotróficas como sendo o ponto-chave para esse estudo. O efeito benéfico da inoculação tem sido apresentado em diferentes trabalhos (Döbereiner & Baldani, 1982;

Reynders & Vlassak, 1982; Boddey et al., 1986; Döbereiner & Salomone, 1995; Salomone & Döbereiner, 1996), porém, muito poucos estudos foram feitos para identificar os mecanismos da interação entre essas bactérias com as enzimas do metabolismo do N e com N acumulado nos grãos e na planta.

Os dados de produção de grãos (PG), conteúdo de N nos grãos (NG) e total da planta (NTP) e atividade das enzimas glutamina sintetase (GS) e nitrato redutase (NR) realizados na variedade Nitroflint, no experimento de campo, são apresentados na Tabela 3. Esse experimento teve dois níveis de adubação nitrogenada, 10 e 100 kg/ha de N, e tratamentos com e sem inoculação de uma mistura de bactérias diazotróficas. Considerando-se a média dos tratamentos com e sem inoculação, observa-se que a adubação nitrogenada teve efeito no Pg, Ng e Ntp, incrementando seus valores. A atividade das enzimas GS (reação da transferase) e NR, dosadas na folha, não foram afetadas pela inoculação e adubação nitrogenada.

Os incrementos de peso e do conteúdo do N nos grãos mostram que as bactérias podem ter influenciado a variedade Nitroflint em melhorar o seu sistema de absorção e utilização do nitrogênio. Porém, não foi possível detectar onde essa contribuição foi mais efetiva. Pode-se, de qualquer forma, aventar a hipótese de que essas bactérias influenciaram a atividade das enzimas do metabolismo do N, principalmente no sistema radicular, permitindo uma maior incorporação do íon amônio em aminoácidos e também incrementando o transporte de N para a parte aérea.

**TABELA 3. Valores médios de produção de grãos (PG) em kg/ha, nitrogênio da planta (NP) e do grão (NG) em kg/ha de N, atividade das enzimas glutamina sintetase (GS) e nitrato redutase (NR) em  $\mu\text{mol}$ /hora/grama de tecido. Ensaio em bloco ao acaso, com dois níveis de adubação nitrogenada (10 e 100 kg/ha de N), com e sem inoculação de bactérias diazotróficas. Dados médios de três repetições.**

Tratamento	PG	NP	NG	GS	NR
Com inoculação					
e 10 kg/ha de N	2780b	16,02b	40,89b	399	1,28
Com inoculação					
e 100 kg/ha de N	5790a	21,23a b	95,13a	403	1,95
Sem inoculação					
e 10 kg/ha de N	1400b	16,80b	22,36b	456	1,21
Sem inoculação					
e 100 kg/ha de N	4830a	24,58a	73,73a	455	1,70
Média	3700	19,66	58,03	428	1,53
CV (%)	27,21	16,09	26,91	12,95	39,01
DMS (5%)	2010	6,32	31,21	ns	ns

Em relação ao experimento em casa de vegetação, são apresentados na Tabela 4 os valores médios da matéria fresca (MF) e atividade das enzimas glutamina sintetase a partir da reação da transferase, dosadas na folha (GSTF) e na raiz (GSTR), e a partir da reação da sintetase dosadas na folha (GSSF) e na raiz (GSSR) e atividade da enzima nitrato redutase dosada na folha (NR). Os caracteres MF, GSSF, GSSR e NR foram influenciados pela adubação nitrogenada e o GSTR foi influenciado pela adição de N apenas no ambiente sem inoculação. A inoculação teve efeito na atividade da enzima GSTR no ambiente com baixo nível de nitrogênio.

O fato de a inoculação não influenciar a atividade da NR deve-se provavelmente à competição das bactérias com NR por carboidratos provenientes da fotossíntese. Vários trabalhos têm verificado também esse fato (Pereira et al., 1978; Smirnov & Stewart, 1985; Machado et al., 1992). As enzimas GSTF e GSTR tiveram comportamento diferenciado; a GSTR apresentou valores superiores de atividade, e a inoculação teve efeito significativo nessa enzima no tratamento com baixo nível de nitrogênio. Esse comportamento indica que as bactérias exerceram alguma influência na atividade da GSTR, aumentando-a, provavelmente em virtude de um incremento da disponibilidade do íon amônio. Sabe-se que genótipos de milho respondem

diferentemente ao íon amônio, cuja concentração afeta a atividade das enzimas de assimilação de amônio (Anghinoni et al., 1988; Magalhães et al., 1993; Magalhães et al., 1995; Sengar & Srivastava, 1995) e a cultivar Nitroflint é considerada eficiente na absorção de amônio, pois apresenta incremento na atividade da enzima GS quando essa forma é predominante (Magalhães et al., 1993). Bactérias diazotróficas, por outro lado, podem excretar amônio em espaços intracelular das raízes, aumentando conseqüentemente a disponibilidade desse íon no sistema radicular (Christiansen-Weniger & Vanderleyden, 1994).

**TABELA 4. Valores médios de produção de massa fresca (MF) em grama/planta e atividade das enzimas glutamina sintetase a partir da reação da transferase realizada na folha (GSTF), e na raiz ( GSTR) e a partir da reação da sintetase na folha (GSF) e na raiz (GSR) e nitrato redutase (NR) em  $\mu\text{mol/hora/grama}$  de tecido fresco. Ensaio em blocos ao acaso com dois níveis de nitrogênio (10 e 100% de N), com e sem inoculação com bactérias diazotróficas. Dados médios de três repetições.**

Tratamento	MF	GSTF	GSTR	GSF	GSR	NR
Com inoculação						
e 10 kg/ha de N	1,06b	139ab	181a	89b	63b	0,12b
Com inoculação						
e 100 kg/ha de N	2,28a	108b	194a	197a	83a	1,15a
Sem inoculação						
e 10 kg/ha de N	0,76b	150a	112b	116ab	56b	0,26b
Sem inoculação						
e 100 kg/ha de N	1,92a	119ab	206a	234a	79a	1,07a
Média	1,50	129	173	159	72	0,65
CV (%)	16,18	12,49	8,16	31,38	11,04	48,26
DMS (5%)	0,48	32,33	28,30	99,83	15,90	0,62

A glutamina sintetase catalisa a reação de formação de glutamina, a partir de glutamato,  $\text{NH}_4^+$  e ATP, que podem ser provenientes da fixação. Assim parece haver relação positiva entre bactérias fixadoras de  $\text{N}_2$  e atividade da glutamina sintetase.

Na Tabela 5 temos o número de bactérias crescidas em três diferentes meios de cultura, denominados LGI (semi-específico para *Azospirillum amazonense*), JNFb (semi específico para *Herbaspirillum seropedicae*) e NFb (semi-específico para *Azospirillum lipoferum*), onde verificou-se que o crescimento de bactérias foi superior nos tratamentos com inoculação, sendo significativamente superior no meio LGI. O LGI praticamente apresentou crescimento somente nos tratamentos com inoculação. Tais dados indicam que ele foi o meio mais confiável no estudo dos efeitos da interação entre inoculação e atividade de enzimas na variedade Nitroflint.

**TABELA 5. Número de bactérias crescidas em três diferentes meios de cultura, denomina-dos: LGI (*A. amazonense*), JNFb (*Herbaspi-rillum spp.*) e NFb (*Azospirillum spp.*) em número de células/mL, realizados na parte aérea e nas raízes. Ensaio em blocos ao acaso com três repetições.**

Tratamento	Parte aérea			Raiz		
	LGI	JNFb	NFb	LGI	JNFb	NFb
Com inoculação <sup>1</sup>	$1,3 \times 10^3$	$3,1 \times 10^5$	$5,8 \times 10^4$	$1,8 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
Sem inoculação	0,00	$1,6 \times 10^4$	$1,4 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$3,8 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$

<sup>1</sup> Inoculação de uma mistura de bactérias diazotróficas.

Na Tabela 6, temos as correlações dos caracteres NP, NG, GS, NR e MF contra PG. Esses caracteres são do experimento realizado no campo, com exceção de MF que é proveniente do experimento em casa de vegetação, incluído para verificar o grau de relação entre os dois experimentos. Verifica-se que NG teve alta correlação com PG em todos os ambientes, e MF correlacionou-se com PG nos ambientes com e sem adubação, negativa e positivamente, respectivamente. Com o incremento da adubação nitrogenada, no ambiente sem inoculação, NG e MF não acompanharam na mesma proporção o aumento de PG, não ocorrendo correlação. O caráter GS teve correlação significativa a 1% de probabilidade com PG, no ambiente sem inoculação e com adubação.

**TABELA 6. Correlação entre produção de grãos (PG) com os conteúdos de nitrogênio total da planta (NP), e dos grãos (NG), e com atividade das enzimas glutamina sintetase (GS) a partir da reação da transferase e nitrato redutase (NR) e massa fresca (MF), nos quatro tratamentos estudados.**

Tratamento	NP	NG	GS	NR	MF
Com inoculação					
e 10 kg/ha de N	-0,014	0,999**	-0,147	-0,811	-0,996**
Com inoculação					
e 100 kg/ha de N	-0,594	0,942	0,482	-0,451	0,579
Sem inoculação					
e 10 kg/ha de N	-0,918	0,974*	0,763	-0,737	0,994**
Sem inoculação					
e 100 kg/ha de N	0,218	0,893	0,994**	-0,606	0,264

Correlação entre os meios de crescimento e os caracteres no ambiente com alto nível de N (100% N) são apresentados na Tabela 7, onde observa-se que na raiz, com exceção de GSR, NR e MF, as demais enzimas tiveram correlação negativa com os meios de crescimento, e essa relação pode ter sido inibida provavelmente pelo incremento da adubação nitrogenada, tanto na parte aérea como na raiz. As correlações dos meios de crescimento com os caracteres no ambiente com baixo nível de N (10% N) são apresentadas na Tabela 8, onde pode-se verificar que o meio LGI correlacionou-se com GSTR de forma significativa, tanto na parte aérea como na raiz. O meio NFb teve correlação significativa com MF nos dois níveis de N, e os meios JNFb e LGI tiveram correlação com MF nos ambientes com alto e baixo nível de N, respectivamente.

**TABELA 7. Correlação entre os meios de crescimento de bactérias denominados NFb (*Azospirillum spp.*), LGI (*A. amazonense*) e JNFb (*Herbaspirillum spp.*) da parte aérea e raiz com atividade das enzimas nitrato redutase (NR), glutamina sintetase a partir da reação da transferase realizada na folha (GSTF) e na raiz (GSTR), e a partir da reação da sintetase realizada na folha (GSF) e na raiz (GSR) e com a massa fresca (MF). Tratamento com inoculação e 100 kg/ha de N.**

Parte aérea	NR	GSTF	GSF	GSTR	GSR	MF
NFb	0,205	-0,267	-0,453	-0,181	0,429	0,899**
LGI	-0,141	-0,183	-0,152	-0,270	0,572	0,482
JNFb	0,434	-0,377	0,577	-0,296	0,035	0,798*
Raiz						
NFb	0,242	-0,750	-0,250	-0,797*	0,114	0,656
LGI	0,178	-0,322	-0,453	-0,250	0,608	0,560
JNFb	0,379	-0,683	-0,250	-0,683	0,023	0,694

\* Significativo a 5% pelo teste T.

\*\* Significativo a 1% pelo teste T.

**TABELA 8. Correlação entre os meios de crescimento de bactérias denominados Nfb (*Azospirillum* spp.), LGI (*A. amazonense*) e JNFb (*Herbaspirillum* spp.) da parte aérea e raiz com atividade das enzimas nitrato redutase (NR), glutamina sintetase a partir da reação da transferase realizada na folha (GSTF) e na raiz (GSTR), e a partir da reação da sintetase na folha (GSF) e na raiz (GSR) e com a massa fresca (MF). Tratamento com inoculação e 10 kg/ha de N.**

Parte aérea	NR	GSTF	GSF	GSTR	GSR	MF
NFb	-0,770	-0,446	-0,580	0,617	0,398	0,874*
LGI	-0,496	-0,375	-0,533	0,779*	0,352	0,790*
JNFb	-0,501	-0,722	-0,394	0,652	0,094	0,722
Raiz						
NFb	-0,201	-0,330	-0,852*	0,298	-0,269	0,411
LGI	-0,631	-0,603	-0,446	0,834*	0,341	0,727
JNFb	-0,256	-0,560	-0,676	0,461	-0,220	0,494

\* Significativo a 5% pelo teste T.

Os dados apresentados no experimento de casa de vegetação, apesar de serem preliminares, indicam a importância das bactérias do tipo *A. amazonense* (crescidas no meio LGI) no incremento da atividade da glutamina sintetase na raiz.

Sabe-se que nas regiões tropicais as variedades de milho devem ter uma certa adaptabilidade na aquisição de N na forma de amônia (Machado & Magalhães, 1995), tolerância a pH baixo (Machado & Magnavaca, 1991), além de tolerância a outros tipos de estresse, pois essas situações prevalecem em solos tropicais sujeitos a freqüentes estresses bióticos e abióticos. Conseqüentemente, é de se supor que as bactérias diazotróficas eficientes nos mecanismos de fixação de nitrogênio em milho podem ter adaptabilidade a pH baixo e ser tolerantes a amônia (Lin et al., 1989). A absorção de N pelas plantas de milho na forma de amônia e a produção de amônia pelas bactérias, fazem com que o ambiente externo da planta (solo e rizosfera) e interno (espaço inter e intra membranas) tenham um pH mais baixo. A variedade Nitroflint apresenta mecanismo eficiente na absorção de amônia (Magalhães et al., 1993; Machado & Magalhães, 1995), e a bactéria *A. amazonense* tem capacidade de atuar em uma faixa larga de pH (inclusive baixo) (Döbereiner et al., 1995).

Este trabalho indica que há correlação positiva entre bactérias do tipo *A. amazonense* e atividade da enzima glutamina sintetase, principalmente na raiz. Essa interação pode, no futuro, auxiliar na seleção de genótipos de milho com alta eficiência de absorção ou fixação biológica do nitrogênio.

## CONCLUSÕES

1. Há efeito da inoculação de bactérias diazotróficas na atividade da glutamina sintetase na raiz.
2. A atividade da glutamina sintetase correlaciona de forma positiva com o crescimento bacteriano no meio LGI.
3. Interação bactéria e atividade da enzima glutamina sintetase (reação da transferase) dosada na raiz pode, no futuro, auxiliar na seleção de genótipos de milho com alta eficiência de absorção ou fixação de nitrogênio.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, D.L. de; SANTOS, G. de A.; DE-POLLI, H.; CUNHA, L.H.; FREIRE, L.R.; AMARAL SOBRINHO, N.M.B. do; PEREIRA, N.N.C.; EIRA, P.A. da; BLOISE, R.M.; SALEK, R.C. **Manual de adubação para o Estado**

- do Rio de Janeiro.** Itaguaí: Editora Universidade Rural, 1988. 179p. (Coleção Universidade Rural. Série Ciências Agrárias, 2).
- ANGHINONI, I.; MAGALHÃES, J.R.; BARBER, S.A. Enzyme activity, nitrogen uptake and corn growth as affected by ammonium concentration in soil solution. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.11, n.2, p.131-144, 1988
- BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.12, p.433-439, 1980.
- BODDEY, R.M.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.95, p.109-121, 1986.
- BREMNER, J.M.; MULVANEY, C.S. Nitrogen total. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. (Eds.). Methods of soil analysis: Part 2, **Chemical and Microbiological Properties**. Madison: American Society of Agronomy/Soil Science Society of America, 1982. p.595-624.
- CHRISTIANSEN-WENIGER, C.; VANDERLEYDEN, J. Ammonium-excreting *Azospirillum* sp. become intracellularly established in maize (*Zea mays* L.) para nodules. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.17, p.1-8, 1994.
- DÖBEREINER, J.; DAY, L.M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: NEWTON, W.E.; NYMAN, C.J. (Eds.). **Nitrogen Fixation**. Pullman: Washington State Univ., 1976. v.2, p.518-538.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. Bases científicas para uma agricultura biológica. **Ciência e Cultura**, Rio de Janeiro, v.34, p.869-881, 1982.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI; Itaguaí: Embrapa-CNPAB, 1995. 60p.
- DÖBEREINER, J.; SALOMONE, I.G. de. Biological dinitrogen fixation in maize. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL: o milho em perspectiva. 1992, Belo Horizonte. **Anais...** Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1995. p.282-294.
- FERGUSON, A.R.; SIMS, A.P. A inactivation in vivo of glutamine synthetase and NAD-specific glutamate dehydrogenase, its role in the regulation of glutamine synthesis in yeasts. **Journal of General Microbiology**, Cambridge, v.69, p.423-427, 1971.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkely, CA: Univ. of California, 1951. p.1-32 (California Agriculture Experiment Station. Circular, 347).
- JAGNOW, G. Inoculation of cereal crops and forage grasses with N-fixing rhizosphere bacteria: Possible causes of success and failure with regard to yield response. A review. **Zeitschrift fuer Pflanzenernaehrung und Bodenkunde**, New York, v.150, p.361-368, 1987.
- LILLO, C. Diurnal variation of nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in barley leaves. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.61, p.214-218, 1984.
- LIN, C.J.; JANE, S.Y.; KUO, H.Y. The effect of inoculation maize seed with free-living N fixing bacteria on the growth and yield of maize. **Journal of Agricultural Research of China**, Taiwan, v.38, n.4, p.395-404, 1989.
- MACHADO, A.T.; MAGALHÃES, J.R. Melhoria de milho para uso eficiente de nitrogênio sob condições de estresse. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL: O milho em perspectiva. 1992, Belo Horizonte. **Anais...** Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1995. p.321-342.
- MACHADO, A.T.; MAGALHÃES, J.R.; MAGNAVACA, R.; SILVA, M.R. Determinação da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio em diferentes genótipos de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Viçosa, v.4, n.2, p.45-47, 1992.
- MACHADO, A.T.; MAGNAVACA, R. **Estresse Ambiental: o milho em perspectiva**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1991. 47p.
- MAGALHÃES, J.R.; HUBER, D.M.; TSAI, C.Y. Influence of the form of nitrogen on ammonium, aminoacids and N-assimilating enzyme activity in maize genotypes. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.18, n.4, p.747-763, 1995.

- MAGALHÃES, J.R.; MACHADO, A.T. Biochemical parameters selecting maize for nitrogen assimilation efficiency under stress conditions. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL: o milho em perspectiva. 1992, Belo Horizonte. **Anais...** Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1995. p.345-367.
- MAGALHÃES, J.R.; MACHADO, A.T.; FERNANDES, M.S.; SILVEIRA, J.A.G. Nitrogen assimilation efficiency in maize genotypes under ammonia stress. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Viçosa, v.5, n.2, p.163-166, 1993.
- MORI, T.E.S. **Metabolismo do nitrogênio durante a fase do desenvolvimento reprodutivo da soja**. Campinas: UNICAMP, Biologia Vegetal, 1981. 94p. Tese de Mestrado.
- OKON, Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. **Trends in Biotechnology**, Essex, v.3, p.223-228, 1985.
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.21, p.197-200, 1996.
- PEREIRA, A.A.; BULOW, J.F.W. Von; NEYRA, C.A. Atividade de nitrogenase, nitrato redutase e acumulação de nitrogênio em milho braquítico, *Zea mays* L. (cv. Piranão) em dois níveis de adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.2, p.28-33, 1978.
- REED, A.J.; BELOW, F.E.; HAGEMAN, R.H. Grain protein accumulation and the relationship between leaf nitrate reductase and proteases activities during grain development in maize (*Zea mays* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v.66, p.1179-1183, 1980.
- REYNDERS, L.; VLASSAK, K. Use of *Azospirillum brasilense* as biofertilizer in intensive wheat cropping. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.66, p.217-223, 1982.
- RHODES, D.; RENDON, G.A.; STEWART, G.R. The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L. **Planta**, Berlin, v.125, p.201-211, 1975.
- SALOMONE, I.G. de; DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.21, n.3, p.193-196. 1996.
- SARIG, S.; BLUM, A.; OKON, Y. Improvement of the water status and yield of field-grown grain sorghum (*Sorghum bicolor*) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.110, p.271-277, 1988.
- SENGAR, R.S.; SRIVASTAVA, H.S. Effect of ammonium salt on enzymes of ammonium assimilation in maize seedlings. **Biologia Plantarum**, Prague, v.37, n.4, p.533-539, 1995.
- SMIRNOFF, N.; STEWART, G.R. Nitrate assimilation and translocation by higher plants: comparative physiology and ecological consequences. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.64, p.133-140, 1985.
- SODEK, L. Mecanismos bioquímicos de enchimento de grãos em leguminosas. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FISILOGIA VEGETAL, 2., 1989, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: SBFV/ESALQ, 1989. p.115-121.