

LUCIMAR RODRIGUES DE OLIVEIRA

**EFICIÊNCIA DE USO DE NITROGÊNIO E ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE
E GLUTAMINA SINTETASE EM MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia,
para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

LUCIMAR RODRIGUES DE OLIVEIRA

**EFICIÊNCIA DE USO DE NITROGÊNIO E ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE
E GLUTAMINA SINTETASE EM MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia,
para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 27 novembro de 2009

Prof. João Carlos Cardoso Galvão
(Co-Orientador)

Prof. Paulo Geraldo Berger
(Co-Orientador)

Pesq. Ivanildo Evódio Marriel

Pesq. Izabel Cristina dos Santos

Prof. Glauco Vieira Miranda
(Orientador)

A Deus,
Ofereço.

Aos meus pais, José Valter de Oliveira (*in memoriam*) e Geny Rodrigues de Oliveira, às minhas irmãs, Lília e Luziane, e aos meus sobrinhos, Lucas, Luiza e André,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida e pelas oportunidades.

Aos meus queridos pais, José Valter de Oliveira (*in memoriam*) e Geny Rodrigues de Oliveira, pelo carinho, pela amizade e pelas orações, sendo sempre um exemplo de vida para mim. Às minhas irmãs, Lília e Luziane, pelo apoio e amizade.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela oportunidade de realização do curso e à Capes e CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Glauco Vieira Miranda, pela amizade, confiança e orientação e, principalmente, pela oportunidade do crescimento acadêmico e profissional.

Ao professor João Carlos Cardoso Galvão, pela amizade, pelos ensinamentos e pelas sugestões na elaboração deste trabalho.

Ao professor Paulo Geraldo Berger, pela amizade e pela contribuição para realização deste trabalho.

À pesquisadora Izabel Cristina dos Santos, pela amizade e pela contribuição para realização deste trabalho.

Ao pesquisador Ivanildo Evódio Marriel, pela participação na banca de defesa de tese e pelas sugestões.

Aos amigos do Programa Milho® UFV, de todas as gerações, em especial, Leandro, Lauro, Aurélio, Julien, Rodrigo Lima, José Roberto, Marcelo, Éder, Tiago, Priscila, Anastácia, Maria Lita, Manoel, Ju Fuscaldi, Jéferson, Jardécio, Ítalo e por todos os momentos compartilhados e, principalmente, pela oportunidade única de conviver com todos.

Aos amigos Domingos e Itamar, pelos ensinamentos e colaboração nos trabalhos de laboratório.

Aos funcionários do Departamento de Fitotecnia, em especial, à Tatiani Gomes e ao Vicente Madaleno, pela competência e sinceridade de sempre.

Enfim, a todos aqueles que, de alguma forma, auxiliaram na elaboração deste trabalho e na minha formação, o meu reconhecimento e a minha gratidão.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT	vii
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS	4
2 ABSORÇÃO E UTILIZAÇÃO DE NITROGÊNIO E ATIVIDADE DA GLUTAMINA SINTETASE E NITRATO REDUTASE EM MILHO	7
2.1 INTRODUÇÃO	9
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
2.4 CONCLUSÕES	18
REFERÊNCIAS	19
3 ATIVIDADES DA NITRATO REDUTASE E DA GLUTAMINA SINTETASE EM LINHAGENS DE MILHO	21
3.1 INTRODUÇÃO	23
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
3.4 CONCLUSÕES	33
REFERÊNCIAS	33
4 EFICIÊNCIA DE USO DE NITROGÊNIO EM MILHO E SUAS RELAÇÕES COM AS ATIVIDADES DAS ENZIMAS NITRATO REDUTASE E GLUTAMINA SINTETASE	37
4.1 INTRODUÇÃO	39
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.4 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	49
5 EFICIÊNCIA DE USO NUTRICIONAL DE HÍBRIDOS DE MILHO COM E SEM ESTRESSE DE NITROGÊNIO.....	53
5.1 INTRODUÇÃO	55
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	57
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.4 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS	64
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	67

RESUMO

OLIVEIRA, Lucimar Rodrigues. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2009. **Eficiência de uso de nitrogênio e atividade da nitrato redutase e glutamina sintetase em milho.** Orientador: Glauco Vieira Miranda; Co-orientadores: João Carlos Cardoso Galvão e Paulo Geraldo Berger.

Os objetivos foram avaliar estratégias para aumentar a eficiência de uso de nitrogênio, como a quantidade de matéria seca produzida por unidade de nitrogênio e as atividades das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase na seleção precoce de plantas de milho. Foram instalados três experimentos em casa de vegetação em vasos preenchidos com areia e dois tratamentos de nitrogênio (N), mantidos em solução de Hoagland. No experimento 1, foram avaliadas dez linhagens de milho sem informação prévia da eficiência de uso de N em dois tratamentos de N (2 mM e 0,2 mM). No experimento 2, foram selecionadas oito linhagens de milho com desempenhos contrastantes quanto à absorção e utilização de N em dois tratamentos de N (10 mM e 1 mM). No experimento 3, foram avaliados vinte e dois híbridos e três testemunhas em dois tratamentos de N (10 mM e 1 mM). Em todos os experimentos de casa de vegetação, as plantas foram colhidas no estágio de quatro folhas completamente desenvolvidas. Para o experimento 1, as características matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSRA), matéria seca total (MSTo), eficiência de uso de nitrogênio (EUN) e atividade da glutamina sintetase (GS) apresentaram diferenças significativas em alto e baixo N. A eficiência de absorção de nitrogênio (EAbN) foi significativa em alto N, e a nitrato redutase (NR), significativa em baixo N. As correlações entre a atividade das enzimas NR e GS e as demais características foram baixas e negativas para alto N e baixas e positivas para baixo N. Para eficiência de utilização de N (EUtN), foram observadas correlações elevadas e significativas com as características MSPA, MSRA, MSTo e EUN em alto e baixo N. Para o experimento 2, a EUN e a EAbN apresentaram diferenças significativas em alto N. As EAbN, EUtN e EUN e as atividades das enzimas NR e GS apresentaram diferenças significativas em baixo N. Para o experimento 3, as características significativas em alto N foram MSPA, relação MSPA/MSR A e EAbN e, em baixo N, foram MSPA, MSRA, MSTo e EUN.

Foram instalados também dois experimentos em campo para avaliação de vinte e dois híbridos e três testemunhas em duas doses de nitrogênio, 120 e 30 kg ha⁻¹, classificadas como alto e baixo N, respectivamente. Em alto N, as características produtividade de grãos (PG), EUN, EUtN e EAbN apresentaram diferenças significativas. Em baixo N, nenhuma das características apresentou diferença significativa. As atividades das enzimas NR e GS não foram eficientes para discriminar híbridos de milho em campo. No experimento 1, em alto N, apenas a GS foi eficiente na discriminação das linhagens e está associada à EUN, e em baixo N, as atividades das enzimas NR e GS foram eficientes e estão associadas à EUN. No experimento 2, em alto N, apenas a EAbN foi eficiente na discriminação das linhagens; a atividade das enzimas NR e GS, a EUtN e EAbN foram eficientes para discriminar as linhagens para EUN em baixo N. No experimento 3, em alto N, as maiores EUN estão associadas a EAbN e a pelo menos uma das enzimas NR e GS com maior atividade; em baixo N, a EUN está associada à maior absorção, utilização do nutriente e à menor atividade da NR e maior atividade da GS. Nos experimentos de campo, os híbridos apresentaram variabilidade genética em alto N; pelo menos uma das eficiências, EUtN ou EAbN, está relacionada com a maior EUN em alto e baixo N; a menor atividade da NR ou a maior atividade da GS está relacionada a EUN. Conclui-se que a seleção de linhagens e híbridos com maior eficiência de uso de nitrogênio não é possível ser realizada com base somente na atividade das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase; a atividade da nitrato redutase e da glutamina sintetase está relacionada com a eficiência de uso de nitrogênio; e os critérios de seleção para identificar genótipos com maior eficiência de uso de nitrogênio variam de acordo com a disponibilidade do nutriente.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Lucimar Rodrigues. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November of 2009. **Nitrogen use efficiency and reductase nitrate and synthetase glutamine activity in corn.** Advisor: Glauco Vieira Miranda; Co-Advisors: João Carlos Cardoso Galvão and Paulo Geraldo Berger.

This work aims to evaluate strategies to increase the nitrogen use efficiency, as the amount of dry matter produced per nitrogen unit and the enzymes activities of reductase nitrate and synthetase glutamine in the early corn plants selection. Three experiments were installed in a greenhouse in pots filled with sand and two treatments of nitrogen (N), maintained in Hoagland solution. In experiment 1, 10 corn strains were evaluated without prior informing about N use efficiency at two N treatments (2 mM and 0.2 mM). In experiment 2, eight corn strains were selected with contrasting performances on the absorption and N utilization in two N treatments (10 mM and 1 mM). In experiment 3, twenty-two hybrids and three witnesses in two N treatments (10 mM and 1 mM) were evaluated. In all greenhouse experiments, the plants were harvested at the four fully quite leaves stage. For experiment 1, the characteristics of air-dry matter (ADM), root dry matter (RDM), total dry matter (TDM), nitrogen use efficiency (NUE) and glutamine synthetase activity (GS) showed significant differences at high and low N doses. The nitrogen absorption efficiency (NAE) was significant at high-N dosis, and nitrate reductase (NR) was significant at low N dosis. The correlations among NR enzymes activity and GS and the other defining features were low; negative for high N; low and positive for low N. For N use efficiency (NUE), high and significant correlations were observed with ADM, RDM, TDM, and NUE characteristics at high and low N. For the experiment 2, NUE and NAE showed significant differences at high N. NAE, NUtE, NUE, and NR and GS enzymes activities showed significant differences at low N. For experiment 3, the significant features in high N were ADM, ADM/RDM relationship, and NAE; at low N were ADM, RDM, TDM, and NUE. Two field experiments to evaluate twenty-two-hybrid and three witnesses in two nitrogen doses, 120 and 30 kg ha⁻¹, were also installed, classified as high and low N, respectively. At high N, the grains productivity (GP) characteristics, NUE, NUtE, and

NAE showed significant differences. At low N, none of the characteristics showed significant difference. The NR enzymes activities and GS were not efficient to discriminate corn hybrids in the field. In experiment 1, at high N, only GS was efficient in the strains discrimination and it is associated with NUE; in low N, the NR and GS enzymes activities were efficient and are associated with NUE. In experiment 2, in high N, only NAE was efficient in the strains discrimination. The NR enzyme and GS activity, NUE and NAE were efficient to discriminate the strains to NUE at low N. In experiment 3, at high N, the highest NUE are associated to NAE and to at least one of NR and GS enzymes with higher activity. At low N, NUE is associated with greater absorption, with nutrient use, with reduced NR activity, and with higher GS activity. In field experiments, the hybrids showed high genetic variability in high N; at least one of the efficiencies, NUtE or NAE is related to higher NUE at high and low N; the lowest NR activity or the highest GS activity is related to NUE. It follows that the strains and hybrids selection with higher nitrogen use efficiency can not be done based only on the nitrate reductase and glutamine synthetase activity; the nitrate reductase and glutamine synthetase activity is related to nitrogen use efficiency; the selection criteria to identify genotypes with greater nitrogen use efficiency vary according to nutrient availability.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A utilização do nitrogênio na agricultura está associada a questões econômicas, sociais e ambientais relacionadas com a sustentabilidade do agroecossistema. A maioria dos produtores de milho no Brasil cultiva esse cereal em solos com baixa disponibilidade de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, obtendo baixa produtividade. Embora o uso de fertilizantes nitrogenados esteja aumentando, provavelmente esse nutriente continuará sendo um importante fator limitante da produção para a cultura do milho, pois a relação entre o preço dos fertilizantes nitrogenados e o preço de venda dos grãos é alta e vem aumentando, limitando o seu uso (AGRIANUAL, 2009).

Mesmo se as dificuldades econômicas para a aplicação de maiores quantidades de fertilizantes nitrogenados forem superadas, e a deficiência nutricional deixar de ser o fator limitante da produção, poderemos vir a ter que conviver com outros tipos de problemas decorrentes do uso de fertilizantes, principalmente nas áreas da saúde e do meio ambiente, devido ao grande potencial poluidor do nitrogênio.

Desta forma, o desenvolvimento de cultivares adaptados aos estresses é estratégia adequada para aumentar a produtividade de milho, para aumentar a segurança alimentar local em regiões onde a fome está presente e para um melhor aproveitamento de recursos não renováveis.

O melhoramento genético visando à obtenção de cultivares eficientes no uso de nitrogênio requer a identificação de genótipos mais tolerantes à deficiência de nitrogênio (LAM *et al.*, 1996). Para isso, é fundamental a identificação mais detalhada dos aspectos relacionados com a fisiologia, bioquímica e genética molecular das plantas tolerantes (MANSKE *et al.*, 2001).

O germoplasma selecionado na ausência de estresses abióticos (limitações de clima e solo) não se mostra adequado para ser utilizado em ambientes com limitações (CECARELLI, 1996; FIDELIS *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2009), pois os genes que controlam a produtividade em condições de estresses abióticos são diferentes daqueles para condições ótimas (ATLIN & FREY, 1989; SOUZA *et al.*, 2008).

As diferenças genéticas em condições contrastantes de cultivo são essenciais para as pesquisas na eficiência de absorção de nutrientes (MANSKE *et al.*, 2001). A variação na disponibilidade de nitrogênio afeta o desenvolvimento das plantas e a produção de grãos em milho (FIDELIS *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2009). Estádios fenológicos, reprodutivos e vegetativos, podem ser alterados pela deficiência de nitrogênio afetando a expansão e a taxa de emergência de folhas (McCULLOUGH *et al.*, 1994; MIRANDA *et al.*, 2005) e o desenvolvimento e morfologia do sistema radicular (EGHBALL *et al.*, 1993; ROCHA, 2008; SOARES *et al.*, 2009; Brito, 2009).

As estratégias para aumentar a eficiência de uso de nitrogênio em milho são: aumentar a capacidade de absorção a partir do maior enraizamento (PENG *et al.*, 2009) ou maior afinidade dos carreadores de nitrato; maior atividade enzimática nas raízes (CHEVALIER & SCHERADER, 1977); aumentar a quantidade de matéria seca produzida por unidade de nitrogênio (MARANVILLE *et al.*, 1980); aumentar a expressão de genes de transporte de nitrogênio (SHRAWAT *et al.*, 2008).

Cultivares eficientes no uso de nitrogênio requerem menores quantidades deste nutriente para produzir de modo econômico, entretanto, para o desenvolvimento de cultivares eficientes é necessária a adoção de métodos que permitam a seleção de genótipos superiores. Essa seleção pode ser realizada com a avaliação direta em baixa disponibilidade de nitrogênio, indireta, em alta disponibilidade, ou considerando as duas situações. Devido à necessidade de genótipos também responsivos ao aumento de insumos, a seleção com base em duas doses contrastantes do nutriente (com e sem estresse) tem-se mostrado a mais adequada (MIRANDA *et al.*, 2005; FIDELIS *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2009).

As maneiras de identificar genótipos eficientes na utilização de nitrogênio são bastante complexas, pois o metabolismo do nitrogênio é influenciado por diversos fatores ambientais (MACHADO *et al.*, 1992). Em função das condições de aeração que predominam nos solos cultivados com milho, a principal forma de nitrogênio absorvido pelas raízes é a nítrica, respondendo o processo de fluxo de massa por 99% do contato íon-raiz no fornecimento de nitrato para o milho (MALAVOLTA, 1979). A absorção do nitrogênio pode ser afetada, dentre outras condições, por solos ácidos, disponibilidade de fósforo e água, toxidez por alumínio e atividade das bactérias nitrificadoras no solo (RHODES, 1987).

O processo de seleção fenotípica de linhagens de milho para eficiência de uso de nitrogênio é extremamente lento, difícil de ser incorporado na rotina do programa de melhoramento e exige muitas atividades de campo de baixa precisão.

Os métodos de seleção dos genótipos superiores apresentam diferentes alternativas que são adequadas para avaliação da produtividade em campo ou para seleção precoce em casa de vegetação sem avaliar a produtividade. Para essas duas situações, é necessário definir em que estágio de desenvolvimento a planta deve ser avaliada, o grau de estresse a ser aplicado, a interação com outros estresses climáticos ou mineral e as características correlacionadas com a produtividade, que serão utilizadas para a seleção.

A maior dificuldade na seleção de genótipos eficientes em campo é determinar a causa da maior produtividade. Por essa razão, o estudo da atividade das enzimas do metabolismo do nitrogênio - nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS) - é de fundamental importância, principalmente para caracterizar populações ou linhagens eficientes na absorção e utilização do nitrogênio (MEDICI *et al.*, 2005).

A NR é considerada uma das enzimas chave na regulação da disponibilidade de nitrogênio reduzido para o metabolismo das plantas. Sua atividade poderia, por isso, estar relacionada com a produtividade de espécies de milho ou com sua capacidade de responder à adubação nitrogenada (BEEVERS & HAGEMAN, 1969).

Genótipos eficientes podem ter alta capacidade de incorporar o íon amônio em aminoácidos principalmente por meio das enzimas GS e glutamato sintase (GOGAT). Com isso, a maior atividade dessas enzimas parece ser um parâmetro adequado na indicação da eficiência de assimilação da amônia (MAGALHÃES & HUBER, 1989).

Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar as diferentes estratégias para aumentar a eficiência de uso de nitrogênio em milho, como a quantidade de matéria seca produzida por unidade de nitrogênio e as atividades das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase.

REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. 14 ed. São Paulo: FNP Consultorias e Agro Informativos. 2009.
- ATLIN, G. N.; FREY, K. J. Breeding crop varieties for low-input agriculture. **American Journal of Alternative Agriculture**, [s.l.], v.4, n.2, p. 53-58, 1989.
- BEEVERS, L.; HAGEMAN, R.H. Nitrate reduction in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 20, p. 495-522, 1969.
- BRITO, C. M. **Variabilidade genética e caracterização do sistema radical de plantas de milho na eficiência de absorção e utilização de fósforo**. 2009. 28f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.
- CECARELLI, S. Adaptation to low/high input cultivation. **Euphytica Journal**, [s.l.], v. 92, n. 1 - 2, p. 203-214, jan. 1996.
- CHEVALIER, P.; SCHRADER, L.E. Genotypic differences in nitrate absorption and partitioning of N among plant parts in maize. **Crop Science**, Madison, v. 17, p. 897-901, 1977.
- EGHBALL, B.; SETTIMI, J. R.; MARANVILLE, J. W.; PARKHURST, M. Fractal analysis for morphological description of corn roots under nitrogen stress. **Agronomy Journal**, [s.l.], v. 85, p. 287-289, 1993.
- FIDELIS, R. R.; MIRANDA, G. V.; SANTOS, I. C.; GALVÃO, J. C. C.; PELUZIO, J. M.; LIMA, S. O. Fontes de germoplasma de milho para estresse de baixo nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 3, p.147-153, 2007.
- LAM, H. M.; COSCHIGANO, K. T.; OLIVIEIRA, I. C.; MELO-OLIVEIRA, R.; CORUZZI, G. M. The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biologic**, [s.l.], v.47, p. 569-593, 1996.
- MACHADO, A. T.; MAGALHÃES, J. R.; MAGNAVACA, R.; SILVA, M. R. Determinação da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo do N em diferentes genótipos de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 4, n. 1, p. 45-47, 1992.
- MAGALHÃES, J.R.; HUBER, D.M. Growth and ammonium assimilation enzyme activity in response to nitrogen forms and pH control. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.12, n.8, p. 985-996, 1989.
- MALAVOLTA, E. **Manual de química agrícola: nutrição de plantas e fertilidade do solo**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1979. 528 p.

MARANVILLE, J. W.; CLARK, R. B.; ROSS, W. M. Nitrogen efficiency in grain sorghum. **Journal of Plant. Nutrition.** [s.l.], v. 2, p. 577-589, 1980.

MANSKE, G. G. B.; ORTIZ-MONASTERIO, J. I.; VLEK, P. L. G. Techniques for measuring genetic diversity in Roots. REYNOLDS, M. P.; ORTIZ-MONASTERIO, J. I.; McNAB (eds.) **Application of physiology in Wheat Breeding.** México: CIMMYT, 2001. p. 208-218.

McCULLOUGH, D. E.; GIRARDIN, P. H.; MIHAJLOVIC, M.; AGUILERA, A.; TOLLENAR, M. Influence of N supply on development and dry matter accumulation of an old and new hybrid. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 74, n. 2, p. 471-478, 1994.

MEDICI, L.O.; PEREIRA, M.B.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Identification of maize lines with contrasting responses to applied nitrogen. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.28, p.903-915, 2005.

MIRANDA, G. V.; GODOY, C. L.; SOUZA, L. V.; SANTOS, I. C. Selection of discrepant maize genotypes for nitrogen use efficiency by a chlorophyll meter. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 5, p. 451-459, 2005.

PENG, Y.; NIU, J.; PENG, Z.; ZHANG, F.; LI, C. Shoot growth potential drives N uptake in maize plants and correlates with root growth in the soil. **Field Crops Research**, [s.l.], v. 115, n. 1, p. 85-93, 2009.

RHODES, D. **Nitrogen metabolism.** Hort 6505. Purdue University, West Lafayette. 1987. 297p.

SHRAWAT, A. K.; CARROLL, R. T.; DEPAUW, M.; TAYLOR, G. J.; GOOD, A. G. Genetic engineering of improved nitrogen use efficiency in rice by the tissue-specific expression of alanine aminotransferase. **Plant Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 6, p.722-732, 2008.

SOARES, M. O.; MARRIEL, I. E.; MAGALHÃES, P. C.; GUIMARÃES, L. J. M.; OLIVEIRA, F. R.; CANTÃO, R. O.; ROCHA, M. C.; JÚNIOR, G. A. C.; MIRANDA, G. V. Discriminação de linhagens de milho quanto à utilização de nitrogênio, por meio da avaliação de características do sistema radicular. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, [s.l.], v.8, n.1, p. 93-103, 2009.

SOUZA, L. V.; MIRANDA, G. V.; GALVÃO, J. C. C.; ECKERT, F. R.; MANTOVANI, E. E.; LIMA, R. O.; GUIMARÃES, L. J. M. Genetic control of grain yield and nitrogen use efficiency in tropical maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.11, p.1517-1523, 2008.

ROCHA, M. C. **Caracterização morfofisiológica radicular relacionada aos mecanismos de aquisição de fósforo em sorgo.** 65f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

SOUZA, L. V.; MIRANDA, G. V.; GALVÃO, J. C. C.; GUMARÃES, L. J. M.; SANTOS, I. C. Combining ability of maize grain yield under different levels of environmental

stress. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n.10, p. 1297-1303, out. 2009.

2 ABSORÇÃO E UTILIZAÇÃO DE NITROGÊNIO E ATIVIDADE DA GLUTAMINA SINTETASE E NITRATO REDUTASE EM MILHO

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi caracterizar linhagens de milho contrastantes quanto à absorção e à utilização de nitrogênio e as atividades das enzimas glutamina sintetase e nitrato redutase em alta e baixa disponibilidade de nitrogênio e estimar a correlação entre características. Foram avaliadas dez linhagens de milho semeadas em vasos com areia em casa de vegetação utilizando dois tratamentos de nitrogênio (N) (2 mM e 0,2 mM). As plantas foram colhidas no estágio de quatro folhas completamente desenvolvidas. As características matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSRA) e matéria seca total (MSTo), eficiência de uso de nitrogênio (EUN) e a atividade da glutamina sintetase (GS) apresentaram diferenças significativas em baixa e alta disponibilidade de N. As correlações entre as atividades das enzimas nitrato redutase (NR) e GS e as demais características foram baixas e negativas para alto N e baixas e positivas para baixo N. Para eficiência de utilização de N (EUN), foram observadas correlações elevadas e significativas com as características MSPA, MSRA, MSTo e EUN em alto e baixo N. As atividades das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase foram adequadas para discriminar as linhagens em baixo nitrogênio; apenas a atividade da glutamina sintetase foi eficiente para discriminar as linhagens em alto nitrogênio, estando associada à eficiência de uso de nitrogênio; as atividades da nitrato redutase e glutamina sintetase estão associadas à eficiência de uso de nitrogênio em baixo nitrogênio.

Palavras chave: *Zea mays*, Melhoramento, Estresse Abiótico, Seleção.

NITROGEN ABSORPTION AND UTILIZATION AND GLUTAMINE SYNTHETASE AND NITRATE REDUCTASE ACTIVITY IN CORN

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize corn inbred strains on the nitrogen absorption and use, the glutamine synthetase and nitrate reductase enzymes activities in high and low nitrogen availability, and to determine the correlation among their features. Ten corn strains were evaluated sown in sand pots in a greenhouse, using two nitrogen doses as treatments (N) (2 mM and 0.2 mM). Plants were harvested at the four fully expanded leaves stage. The air-dry matter (ADM) characteristics, root dry matter (RDM), total dry matter (TDM), N use efficiency (NUE), and the glutamine synthetase (GS) activity showed significant differences at low and high N availability. The correlations among the nitrate reductase (NR) and GS activities and the other characteristics were low and negative for high N; they were low and positive for low N. For N utilization efficiency (NUE), high and significant correlations with ADM, RDM, and NUE characteristics were found at high and low N. The nitrate reductase and glutamine synthetase activities were adequate to discriminate the strains in low nitrogen; only the glutamine synthetase activity was useful for distinguishing high nitrogen strains, being associated with nitrogen use efficiency; the nitrate reductase and glutamine synthetase activities are associated with nitrogen use efficiency at low nitrogen.

Key-words: *Zea mays*, Improvement, Abiotic Stress, Selection.

2.1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio é considerado um dos principais nutrientes a limitar o crescimento e a produtividade dos vegetais. Os vegetais acumulam matéria seca na forma de carboidratos, proteínas e lipídeos, visando a assegurar o suprimento de esqueletos de carbono e energia química para o crescimento ou manutenção, quando não há produção de fotoassimilados (BUCKERIDGE *et al.*, 2004).

Plantas cultivadas com quantidades inadequadas de nitrogênio normalmente não expressam o seu potencial produtivo e crescimento, visto que, sob tais condições, podem ocorrer reduções significativas na taxa fotossintética, um dos principais determinantes do crescimento vegetal. O efeito negativo da deficiência de nitrogênio sobre a taxa fotossintética pode estar relacionado, dentre outros fatores, à expansão foliar e à atividade de algumas enzimas do ciclo redutivo do nitrogênio, como a nitrato redutase (NR), que, no processo de redução e assimilação do nitrato em plantas, é a primeira e mais importante enzima.

A atividade da NR depende, principalmente, da luz e do contínuo suprimento de nitrato através do xilema (KAWACHI *et al.*, 2002). Há evidências de que ela é a principal enzima que limita a absorção do nitrogênio em muitas plantas.

A glutamina sintetase (GS) é outra enzima importante no processo de incorporação do nitrogênio, pois catalisa a etapa chave da assimilação do nitrogênio inorgânico, que é a incorporação do amônio ao glutamato produzindo a glutamina. A glutamina é então utilizada como doador de grupamento amino para síntese de um grande número de metabólicos essenciais como aminoácidos, ácidos nucleicos e açúcares aminados. Assim, a síntese de glutamina pela GS é considerada base da produtividade das plantas (UNNO *et al.*, 2006).

Todo o nitrogênio na planta é canalizado pelas reações catalisadas pela GS. Nos cereais, é provável que a atividade da GS seja um ponto importante no controle do crescimento e da produtividade das plantas (MIFLIN & HABASH, 2002).

Estudando as bases genéticas e bioquímicas da eficiência de uso de nitrogênio em milho, Hirel *et al.* (2001) encontraram correlações significativas entre características fisiológicas (atividades das enzimas NR e GS, teor de nitrato na parte aérea das plantas) e características agronômicas (produtividade e peso de grãos).

Em um programa de melhoramento, o conhecimento das associações entre características de interesse é de fundamental importância na obtenção de populações melhoradas. Em continuidade a este trabalho, Gallais e Hirel (2004) enfatizaram que estas correlações foram dependentes da quantidade da fertilização nitrogenada. Estes autores descreveram que, sob alta disponibilidade de nitrogênio, a eficiência de uso de nitrogênio foi explicada pela variação da capacidade da planta em absorver nitrogênio, enquanto em baixa disponibilidade de nitrogênio, esta capacidade foi atribuída à variação da eficiência de utilização de nitrogênio.

A eficiência é definida como a capacidade de determinado genótipo em adquirir o nutriente para incorporá-lo e utilizá-lo na produção de biomassa ou material vegetal de rendimento econômico, que, no caso dos cereais, inclui especialmente os grãos. Os critérios ou definições de eficiência são vários e, geralmente, dividem-se entre os que enfatizam a produtividade e aqueles que enfatizam o requerimento interno do nutriente pela planta. Estes são dependentes de características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas dos vegetais.

Os melhores critérios para avaliar cultivares mais eficientes na absorção e utilização do nutriente têm sido aqueles que utilizam o crescimento e desenvolvimento das plantas em baixa disponibilidade do nutriente, verificando se a eficiência nutricional, que ocorre por várias razões, está relacionada à absorção, ao transporte ou à utilização do nutriente pelas plantas.

No melhoramento de plantas para a identificação de cultivares eficientes na absorção e utilização do nutriente, é necessário estabelecer metodologias rápidas, de baixo custo, e que permitam avaliar um maior número de plantas, famílias ou populações.

O estudo em solução nutritiva traz vantagens no sentido de poder controlar as condições de crescimento das plantas, de estudar características secundárias de alta herdabilidade e correlacionadas com a produtividade, como a atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo do nitrogênio (MIRANDA *et al.*, 2005). Estas avaliações podem ser realizadas em fase precoce de desenvolvimento das plantas e permite comparar um número relativamente grande de genótipos num curto espaço de tempo, podendo assim acelerar o processo de seleção. Torna-se essencial, entretanto, a obtenção de dados comparativos em solo para concluir se a técnica em

solução nutritiva pode ser usada como ferramenta auxiliar na seleção e no melhoramento de plantas, quanto às características nutricionais.

A avaliação da capacidade de absorção e de utilização do nitrogênio em cada estágio do desenvolvimento da planta pode ser utilizada nos programas de melhoramento visando à obtenção de cultivares que sejam mais eficientes no uso de nitrogênio. Estudos agrônômicos feitos com o milho têm demonstrado que diversos grupos de genes são diferencialmente expressos em resposta à quantidade de nitrogênio fornecida à planta (BORGES, 2006; SOUZA *et al.*, 2008).

Recentes pesquisas, que tiveram como objetivo avaliar a eficiência de uso do nitrogênio em milho e a atividade de várias enzimas, indicaram ser possível detectar variações genéticas e selecionar novos genótipos que mostrem aumento ou diminuição da atividade de enzimas envolvidas nas vias de assimilação de nitrogênio (HIREL *et al.*, 2001). Neste trabalho, evidencia-se que os genes que codificam a GS podem ser bons candidatos ao controle da eficiência de uso de nitrogênio.

Hirel *et al.* (2001) sugerem que plantas de milho selecionadas para uma elevada eficiência de uso de nitrogênio deveriam possuir alta capacidade de absorver o nitrogênio e armazená-lo nos primeiros estádios de crescimento vegetativo. Estes mesmos autores também sugerem que, durante a fase de crescimento vegetativo, essas plantas teriam uma baixa atividade da NR, o que favoreceria o acúmulo de nitrato nos tecidos, que poderia ser usado no final do ciclo para produção de grãos.

Os objetivos deste trabalho foram caracterizar linhagens de milho contrastantes quanto à absorção e utilização de nitrogênio e a atividade das enzimas glutamina sintetase e nitrato redutase em alta e baixa disponibilidade de nitrogênio, e estimar a correlação entre características.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado na casa de vegetação do Programa Milho®, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG, de setembro a outubro de 2008.

Foram avaliadas em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, dez linhagens endogâmicas de milho provenientes do Programa Milho® UFV. Estas linhagens foram semeadas em vasos opacos com volume de 5 dm³, preenchidos com areia lavada. As linhagens foram avaliadas em dois tratamentos distintos quanto à disponibilidade de nitrogênio, alta (2 mM) e baixa (0,2 mM).

Foram cultivadas três plantas por vaso e cinco dias após a emergência das plântulas iniciou-se o fornecimento de 250 ml vaso⁻¹, a cada dois dias, de solução nutritiva de *Hoagland* modificada.

No estágio de desenvolvimento V4, foram coletadas as amostras para as análises das atividades da nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS), realizadas sempre entre 7:00 e 8:00 da manhã. Foram retirados discos foliares de oito mm de diâmetro obtidos da terceira folha contada a partir da base da planta, que foram pesados separadamente para as análises enzimáticas.

A determinação da atividade da NR foi feita empregando-se o ensaio *in vivo*. Os discos foliares foram incubados em 10 mL de meio tampão fosfato (KH₂PO₄ e K₂HPO₄) 0,2 M (pH 7,5), nitrato de potássio 0,25 M, propanol e Triton X 100 10%. Após a imersão, as amostras foram transferidas para o dessecador e submetidas à infiltração a vácuo, por um minuto, três vezes, com a finalidade de aumentar a penetração da solução nos tecidos.

Em seguida, os frascos de incubação envoltos em papel alumínio foram levados ao banho-maria a 30° C. Nos tempos previamente ajustados de 30 e 60 minutos, foram retiradas alíquotas de um mL, adicionando a cada uma 0,3 mL de sulfanilamida 1%, 0,3 mL de α - naftilenodiamino 0,02 % e 2,4 mL de água.

A leitura foi feita em espectrofotômetro a 540 nm, sendo a atividade da NR determinada pela quantidade de nitrito produzida comparando os valores obtidos com a curva padrão para esse íon, e a atividade foi expressa em μmoles de nitrito por hora por grama de matéria fresca (μmoles de NO₂⁻/hora/ g matéria fresca).

Para análise da atividade da GS, os discos foram macerados em almofariz contendo meio de extração constituído de tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,9), 2-mercaptoetanol (74 mM) e MgCl₂ (20 mM). O material foi transferido para ependorfs e centrifugado a 10.000 x g, por 30' a 4 °C. Foram adicionados 0,5 mL dos extratos a um meio de reação contendo tampão Tris-HCl (260 mM, pH 7,3), glutamato (500 mM, pH 7,3), MgCl₂ (120 mM), ATP (52 mM) e hidroxilamina (500 mM), com o

volume final de 2 mL. Essa mistura foi incubada, por 20 min, a 30°C. A reação foi paralisada pela adição de um mL de uma solução contendo cloreto férrico (20 g de ácido tricloroacético, 16 g de cloreto férrico anidro dissolvidos em 24 mL de HCl 0,5 N). Em seguida, a mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 5', obtendo-se o quelato Fe-L-glutamil-g-hidroxamato.

A leitura foi feita a 540nm em espectrofotômetro, utilizando-se o coeficiente de extinção molar do glutamil-hidroxamato ($700 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ou $0,7 \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) como curva padrão para comparação dos resultados lidos no espectrofotômetro. A atividade da GS foi expressa em μmoles de glutamil-hidroxamato (GHD) produzido por hora por grama de matéria fresca ($\mu\text{moles GHD/hora/ g}$ matéria fresca).

Após a coleta para as análises enzimáticas, as plantas inteiras foram retiradas dos vasos, separou-se a raiz da parte aérea, e o material vegetal foi seco em estufa a 70 °C até atingir massa constante. Após a secagem, foram obtidas a matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSRA) e matéria seca total (MSTo). Pelo método de digestão sulfúrica, foram mensurados os conteúdos de nitrogênio na parte aérea (CNA), na raiz (CNR) e o nitrogênio total (CNT).

A partir das características MSTo, CNT e do nitrogênio aplicado às plantas (NA, g vaso^{-1}), foram calculadas a eficiência de uso de nitrogênio (EUN, massa seca total/ N aplicado), a eficiência de utilização de nitrogênio (EUtN, massa seca total/ conteúdo de N na planta) e a eficiência de absorção de nitrogênio (EAbN, conteúdo de N na planta/ N aplicado), segundo Moll *et al.* (1982).

Foram feitas as análises de variância e a estimativa do coeficiente de correlação de Pearson entre os diferentes caracteres. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste DMS-t a 5% de probabilidade.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSRA), matéria seca total (MSTo), eficiência de uso de nitrogênio (EUN) e atividade da glutamina sintetase (GS) apresentaram diferenças significativas em alto

e baixo nitrogênio (N) (TABELA 2.1). Isso mostra a existência de variabilidade genética entre as linhagens para estas características e que é possível a seleção de genótipos superiores quanto ao uso de N, também verificado por outros autores, que identificaram a existência de variabilidade genética para essas características (HIREL *et al.*, 2001; GALLAIS & HIREL, 2004; MIRANDA *et al.*, 2005; FIDELIS *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2008).

TABELA 2.1 - Resumo das análises de variância das características: matéria seca da parte aérea (MSPA, g vaso⁻¹), matéria seca da raiz (MSRA, g vaso⁻¹), matéria seca total (MSTo, g vaso⁻¹), eficiência de uso de nitrogênio (EUN), eficiência de utilização (EUtN), eficiência de absorção (EAbN), atividades da nitrato redutase (NR, $\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ grama de matéria fresca (MF)) e glutamina sintetase (GS, $\mu\text{moles de GHD h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ MF) em linhagens de milho, em alto e baixo nitrogênio (N)

Alto N									
Quadrados Médios									
FV	GL	MSPA	MSRA	MSTo	EUN	EUtN	EAbN	NR	GS
Tratamento	9	0,70**	1,26**	3,50**	179,02**	20,95 ^{ns}	0,047**	0,026 ^{ns}	24,83**
Resíduo	20	0,19	0,28	0,44	22,61	35,12	0,008	0,017	5,27
Média		2,18	3,28	5,46	39,04	56,78	0,69	0,51	11,55
CV (%)		20	16	12	12	10	13	25	19
Baixo N									
Quadrados Médios									
FV	GL	MSPA	MSRA	MSTo	EUN	EUtN	EAbN	NR	GS
Tratamento	9	0,75**	0,83**	2,60**	1059,08**	115,97 ^{ns}	0,052 ^{ns}	0,081**	33,75**
Resíduo	20	0,08	0,23	0,43	176,81	100,58	0,023	0,019	6,36
Média		2,63	3,6	6,23	125,7	110,72	1,13	0,32	13,45
CV (%)		10	13	10	10	9	13	43	18

*, ** significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente; ^{ns} não significativo.

As médias de MSPA (2,63 g), MSRA (3,60 g) e MSTo (6,23 g) foram superiores em baixo N em relação ao alto N (TABELA 2.1). Existe diferença entre os genótipos na partição da biomassa entre a parte aérea e a raiz em alto e baixo N (HÉBERT *et al.*, 2001). Estes resultados mostraram que, para plantas submetidas a uma baixa disponibilidade de N, o desenvolvimento do sistema radicular determina sua eficiência na absorção de nutrientes, podendo manter também o crescimento da parte aérea, como relatado por Peng *et al.* (2009).

Em alto N, a eficiência de absorção de N (EAbN) das linhagens apresentou diferença significativa, indicando que a EUN estava em função da diferença na EAbN, confirmando o que está relatado na literatura (GALLAIS & HIREL, 2004).

Para EUN e seus componentes, eficiência de utilização de N (EUtN) e EAbN, verificou-se que as médias foram maiores em baixo do que em alto N (TABELA 2.1).

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por outros autores (URIBELARREA *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2008).

A atividade da nitrato redutase (NR) não apresentou diferença significativa entre as linhagens em alto N. Apesar da não significância, a atividade dessa enzima em alto N foi maior que em baixo N, tendo apresentado diferença significativa (TABELA 2.1). Isso pode ser devido ao fato de a NR ser regulada pela disponibilidade de nitrato no meio e que foi maximizada em alto N. Outras pesquisas confirmaram a maior atividade da NR em plantas de milho em alto N (MAJEROWICS *et al.*, 2002) e em *Arabidopsis*, quando avaliadas em alta e baixa disponibilidade desse nutriente (LEMAITRE *et al.*, 2008). Por outro lado, em baixo N, as linhagens apresentaram diferentes eficiências metabólicas relacionadas ao N, mostrando a utilidade da quantificação dessa enzima para selecionar genótipos superiores em baixo N.

A atividade da GS apresentou diferença significativa em alto e baixo N (TABELA 2.1). Em baixo N, a GS apresentou atividade superior em relação ao alto N. Lemaître *et al.* (2008), ao avaliarem acessos de *Arabidopsis* em alto e baixo N, verificaram que a atividade da GS era maior em plantas cultivadas em baixo N comparada à atividade dessa enzima nas plantas cultivadas em alto N e também que a atividade aumentava com a senescência.

TABELA 2.2 - Médias das características matéria seca da parte aérea (MSPA, g vaso⁻¹), matéria seca da raiz (MSRA, g vaso⁻¹), matéria seca total (MSTo, g vaso⁻¹), eficiência de uso de nitrogênio (EUN), eficiência de utilização (EUtN), eficiência de absorção (EAbN), atividades da nitrato redutase (NR, µmoles de NO₂⁻ h⁻¹ g⁻¹ matéria fresca (MF)) e glutamina sintetase (GS, µmoles de GHD h⁻¹ g⁻¹ MF) em linhagens de milho, em alto nitrogênio

Tratamento	MSPA	MSRA	MSTo	EUN	EUtN	EAbN	NR	GS
L 08-1823-2	2,96	4,36	7,33	52,38	56,9	0,91	0,48	8,35
L 08-1199-1	2,46	3,8	6,26	44,76	57,81	0,77	0,5	11,01
L 08-2923-4	2,7	3,33	6,03	44,09	58,91	0,73	0,68	12,31
L 08-869-2	2,3	3,46	5,76	41,19	54,81	0,75	0,43	15,74
L 08-1471	2,03	3,6	5,63	40,23	54,79	0,73	0,51	12,64
L 08-2924-4	1,86	2,16	4,03	28,8	52,19	0,55	0,45	13,34
L 08-1400-2	2,23	3,33	5,56	39,76	61,74	0,64	0,46	12,25
L 08-1816-3	2,13	3,4	5,53	39,52	57,94	0,68	0,46	7,71
L 08-1429-1	1,86	3,06	4,93	35,23	55,36	0,63	0,47	14,68
L 08-853-2	1,23	2,33	3,56	25,47	57,36	0,46	0,69	7,5
Média	2,18	3,28	5,46	39,04	56,78	0,69	0,51	11,55
DMS-t _{5%}	0,75	0,9	1,13	8,1	10,09	0,15	0,22	3,91

Em alto N, as cinco linhagens com valores superiores de EUN também apresentaram os maiores valores de EAbN (TABELA 2.2). Isso confirmou que, em alta disponibilidade de N, a variabilidade genética para EUN é função da EAbN (TABELA 2.2). Entre estas estão as linhagens 08-2923-4 (58,91), 08-1199-1 (57,81) e 08-1823-2 (56,9), que também apresentaram EUtN superior.

A linhagem 08-853-2 foi a que apresentou a maior atividade da NR e o menor valor de EUN, já a linhagem 08-1823-2 apresentou atividade da NR abaixo da média e o maior valor de EUN (TABELA 2.2). Durante a fase vegetativa de crescimento, plantas de milho deveriam manter uma baixa atividade da NR, de maneira que o nitrato acumulado nos vacúolos pudesse ser posteriormente remobilizado para a produção de grãos (HIREL *et al.*, 2001).

Com relação à GS, Magalhães e Huber (1989) consideram provável que alta atividade dessa enzima seja um indicativo de genótipos mais eficientes na assimilação do amônio. Segundo Miflin e Habash (2002), é provável que a atividade da GS seja um ponto importante no controle do crescimento e da produtividade das plantas.

TABELA 2.3 - Médias das características matéria seca da parte aérea (MSPA, g vaso⁻¹), matéria seca da raiz (MSRA, g vaso⁻¹), matéria seca total (MSTo, g vaso⁻¹), eficiência de uso de nitrogênio (EUN), eficiência de utilização (EUtN), eficiência de absorção (EAbN), atividades da nitrato redutase (NR, µmoles de NO₂⁻ h⁻¹ g⁻¹ matéria fresca (MF)) e glutamina sintetase (GS, µmoles de GHD h⁻¹ g⁻¹ MF) em linhagens de milho, em baixo nitrogênio

Tratamento	MSPA	MSRA	MSTo	EUN	EUtN	EAbN	NR	GS
L 08-1823-2	3,4	3,9	7,3	148,5	111,5	1,33	0,39	10,4
L 08-2923-4	3	4,2	7,2	146,5	117,4	1,25	0,37	16,4
L 08-1471	2,9	4,1	7	141,8	108	1,31	0,36	18,6
L 08-1400-2	3,1	3,6	6,8	137,7	122,8	1,13	0,43	12,1
L 08-1429-1	2,6	3,6	6,3	127	112,9	1,12	0,1	16,5
L 08-1199-1	2,4	3,7	6,2	125,6	112,2	1,12	0,21	12
L 08-869-2	2,7	3,1	5,8	117,6	108,8	1,08	0,34	16,5
L 08-1816-3	2,1	3,6	5,7	115,5	107,7	1,07	0,13	9,6
L 08-853-2	1,9	3,4	5,3	107,5	104,1	1,04	0,65	9,2
L 08-2924-4	2	2,4	4,4	89,3	101,5	0,89	0,18	12,7
Média	2,6	3,6	6,2	125,7	110,7	1,13	0,32	13,4
DMS-t _{5%}	0,48	0,82	1,12	22,64	17,08	0,26	0,23	4,29

Em baixo N, as linhagens 08-1823-2, 08-2923-4, 08-1471, 08-1400-2 e 08-1429-1 apresentaram valores superiores de EUN, o que pode ser atribuído aos maiores valores de EUtN e EAbN (TABELA 2.3), mostrando que, em baixo N, estes

dois componentes foram importantes. As linhagens 08-2924-4 e 08-853-2 apresentaram valores inferiores de EUN, EUtN e EAbN (TABELA 2.3).

Em baixo N, a linhagem 08-853-2 apresentou comportamento semelhante ao alto N, com os menores valores de EUN e seus componentes, maior atividade da NR e menor atividade da GS, evidenciando a influência destas enzimas na EUN (TABELA 2.3).

A característica MSRA apresentou valores superiores à MSPA para todas as linhagens em alto e baixo N, sendo esta a característica que mais contribuiu para MSTo (TABELA 2.2; 2.3). Estas características foram eficientes para diferenciar linhagens em alto e baixo N, mostrando que neste estágio de desenvolvimento, dentro deste grupo de linhagens, é possível selecionar linhagens para as duas condições. As médias dessas características foram superiores em baixo N, porém próximas às médias em alto N.

A linhagem 08-1823-2 foi a que se destacou em alto e baixo N para as características MSPA, MSTo, EUN e EAbN, apresentando valores superiores aos obtidos pelas demais linhagens (TABELA 2.2; 2.3).

TABELA 2.4 - Coeficiente de correlações de Pearson (r) entre as características matéria seca da parte aérea (MSPA, g vaso⁻¹), matéria seca da raiz (MSRA, g vaso⁻¹), matéria seca total (MSTo, g vaso⁻¹), eficiência de uso de nitrogênio (EUN), eficiência de utilização (EUtN), eficiência de absorção (EAbN), atividades da nitrato redutase (NR, $\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ matéria fresca (MF)) e glutamina sintetase (GS, $\mu\text{moles de GHD h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ MF) em alto (acima da diagonal) e baixo (abaixo da diagonal) nitrogênio, em linhagens de milho

	MSPA	MSRA	MSTo	EUN	EUtN	EAbN	NR	GS
MSPA		0,82**	0,93**	0,93**	0,91**	0,27	-0,24	0,04
MSRA	0,63*		0,96**	0,96**	0,94**	0,32	-0,27	-0,1
MSTo	0,89**	0,91**		1,00**	0,97**	0,31	-0,27	-0,04
EUN	0,89**	0,91**	1,00**		0,97**	0,31	-0,27	-0,04
EUtN	0,81**	0,89**	0,94**	0,94**		0,1	-0,33	0,02
EAbN	0,70*	0,51	0,67*	0,67*	0,42		0,28	-0,35
NR	0,15	0,18	0,18	0,18	0,22	0,06		-0,3
GS	0,34	0,23	0,31	0,31	0,32	0,18	-0,16	

*, ** significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

Dentre todas as características, aquelas que apresentaram correlações positivas com EUN em alto e baixo N foram MSPA, MSRA, EUtN e EAbN (TABELA

2.4). Estes resultados mostraram a importância de estudar características morfológicas e fisiológicas na seleção de genótipos mais EUN.

A MSto em alto e baixo N apresentou elevada correlação positiva com a MSRA, 0,96 em alto e 0,91 em baixo N, evidenciando a importância do sistema radicular para absorção de nutrientes e produção de matéria seca (TABELA 2.4).

Em alto N, a correlação entre a atividade das enzimas NR e GS e as demais características foi baixa e negativa, indicando que em alto N essas duas enzimas *per se* não são parâmetros confiáveis para obter genótipos com alta EUN (TABELA 2.4). Em baixo N, a atividade das enzimas NR e GS apresentaram baixas correlações com as demais características, não sendo eficiente a seleção com base na atividade destas enzimas visando a maior EUN, EAbN e EUtN.

Para EUtN em alto e baixo N, foram observadas correlações elevadas e significativas com as características MA, MR, MT e EUN (TABELA 2.4).

Em alto N, a EAbN apresentou baixas correlações com as demais características, e em baixo N, a EAbN apresentou correlações significativas com a MA, MT e EUN.

2.4 CONCLUSÕES

- Em alto nitrogênio, as linhagens apresentaram desempenho diferenciado em relação às eficiências de uso e de absorção de nitrogênio, e em baixo nitrogênio apenas em relação à eficiência de uso de nitrogênio;
- Em alto nitrogênio, apenas a atividade da glutamina sintetase é eficiente na discriminação das linhagens, e em baixo, as atividades da nitrato redutase e glutamina sintetase são eficientes para discriminar as linhagens;
- A glutamina sintetase está associada à eficiência de uso de nitrogênio em alto nitrogênio, e em baixo nitrogênio, a nitrato redutase e a glutamina sintetase estão associadas à eficiência de uso de nitrogênio, mas não correlacionadas;

- Em alto nitrogênio, as enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase apresentaram correlações baixas e negativas com as demais características; e,
- Em baixo nitrogênio, as atividades das enzimas apresentaram baixas correlações com as demais características, não sendo eficiente a seleção com base na atividade destas enzimas neste grupo de genótipos.

REFERÊNCIAS

BORGES, E.; A.; FERNANDES, M. S.; LOSS, A.; SILVA, E. E.; SOUZA, S. R. Acúmulo e remobilização de nitrogênio em variedades de milho. **Caatinga**, [s.l.], v.19, n.3, p.278-286, 2006.

BUCKERIDGE, M. S.; AIDAR, M. P. M.; SANTOS, H. P. TINÉ, M. A. Acúmulo de Reservas. In: FERREIRA; A. G.; BORGHETTI, F. (Eds.) **Germinação - do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.31-50.

FIDELIS, R. R.; MIRANDA, G. V.; SANTOS, I. C.; GALVÃO, J. C. C.; PELUZIO, J. M.; LIMA, S. O. Fontes de germoplasma de milho para estresse de baixo nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.37, n.3, p.147-153, 2007.

GALLAIS, A.; HIREL, B. An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. **Journal of Experimental Botany**, London, v.55, n.396, p. 295-306, 2004.

HÉBERT, Y.; GUINGO, E.; LOUDET, O. The response of Root/Shoot partitioning and root morphology to light reduction in maize genotypes. **Crop Science**, Madison, v.41, p.363-371, 2001.

HIREL, B.; BERTIN, P.; QUILLÉRE, I. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. **Plant Physiology**, Rockville, v.125, p. 1258-1270, 2001.

KAWACHI, T. Y. et al. Role of xylem sap nitrate in regulation of nitrate reductase gene expression in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v.48, n.1, p.79-85, 2002.

LEMAITRE, T.; GAUFICHON, L.; BOUTET- MERCEY, S.; CHRIST, A.; MASCLAUX-DOUBRESSE, C. Enzymatic and metabolic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana* Wassileskija accession. **Plant Cell Physiol**, [s.l.], v.49, n.7, p.1056-1065, 2008.

MAGALHÃES, J. R.; HUBER, D. M. Growth and ammonium assimilation enzyme activity in response to nitrogen forms and pH control. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.12, n.8, p.985-996, 1989.

MAJEROWICZ, N.; PEREIRA, J. M. S.; MEDICI, L. O.; BISON, O.; PEREIRA, M. B.; SANTOS JÚNIOR, U. M. Estudo da eficiência de uso do nitrogênio em variedades locais e melhoradas de milho. **Revista Brasileira Botânica**, [s.l.], v.25, n.2, p.129-136, 2002.

MIFLIN B. J.; HABASH, D. Z. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. **Journal of Experimental Botany**, London, v.53, n.370, p.979-987, 2002.

MIRANDA, G. V.; GODOY, C. L.; SOUZA, L. V.; SANTOS, I. C. Selection of discrepant maize genotypes for nitrogen use efficiency by a chlorophyll meter. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.5, n.4, p.451-459, 2005.

MOLL, R. H.; KAMPRATH, E. L.; JACKSON, A. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. **Agronomy Journal**, Madison, v. 74, p.562-564, 1982.

PENG, Y.; NIU, J.; PENG, Z.; ZHANG, F.; LI, C. Shoot growth potential drives N uptake in maize plants and correlates with root growth in the soil. **Field Crops Research**, [s.l.], v.115, n.1, p.85-93, 2009.

SILVA, R. G.; CRUZ, C. D.; MIRANDA, G. V.; GALVÃO, J. C.C.; SILVA, D. G. Adaptabilidade de famílias de meio-irmãos de milho submetidas ao déficit hídrico e baixa disponibilidade de nitrogênio. **Revista Ceres**, [s.l.], v.55, p.344-351, jul-ago 2008.

SOUZA, L. V.; MIRANDA, G. V.; GALVÃO, J. C. C.; ECKERT, F. R.; MANTOVANI, E. E.; LIMA, R. O.; GUIMARÃES, L. J. M. Genetic control of grain yield and nitrogen use efficiency in tropical maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n. 11, p.1517-1523, 2008.

UNNO, H.; UCHIDA, T, SUGAWARA, H.; KURISU, G.; SUGIYAMA, T.; YAMAYA, T.; SAKAKIBARA, H.; HASE, T.; KUSUNOKI, M. Atomic Structure of Plant Glutamine Synthetase. **The Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 281, n. 39, p.29287-29296, 2006.

URIBELARREA, M.; MOOSE, S.P.; BELOW, F.E. Divergent selection for grain protein affects nitrogen use in maize hybrids. **Fields Crops Research**, [s.l.], v.100, n.1, p.82-90, 2007.

3 ATIVIDADES DA NITRATO REDUTASE E DA GLUTAMINA SINTETASE EM LINHAGENS DE MILHO

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi verificar se a seleção de linhagens de milho para eficiência de uso de nitrogênio pode ser feita pelas atividades da nitrato redutase e glutamina sintetase neste grupo de genótipos. Para isso, foram selecionadas oito linhagens de milho com desempenhos contrastantes quanto à absorção e utilização de nitrogênio (N). Essas linhagens foram avaliadas em experimentos de vasos com areia em casa de vegetação, utilizando dois tratamentos de N (10 mM e 1 mM) e mantidas em solução de *Hoagland*. As plantas foram colhidas no estágio de quatro folhas completamente desenvolvidas. As características eficiência de absorção de nitrogênio (EAbN), eficiência de utilização de nitrogênio (EUtN), eficiência de uso de nitrogênio (EUN) e as atividades das enzimas nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS) apresentaram diferenças significativas em baixo N. A EUN e a EAbN apresentaram diferenças significativas em alto N. Conclui-se que, em alto nitrogênio, as atividades das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase foram inadequadas e a eficiência de absorção de nitrogênio foi adequada na discriminação das linhagens de milho e está relacionada com a eficiência de uso de nitrogênio; em baixo nitrogênio, as eficiências de absorção e de utilização, a menor atividade da nitrato redutase e a maior atividade da glutamina sintetase foram eficientes para discriminar linhagens para eficiência de uso de nitrogênio.

Palavras-chave: Melhoramento, Estresse Abiótico, Nitrogênio, Seleção, Eficiência de Uso.

NITRATE REDUCTASE AND GLUTAMINE SYNTHETASE ACTIVITIES IN CORN STRAINS

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine whether the selection of corn strains for nitrogen use efficiency could be accomplished by the nitrate reductase and glutamine synthetase activities in this genotypes group. For this, eight corn strains were selected with contrasting performances on the nitrogen (N) absorption and utilization. These strains were evaluated in experiments with sand pots in a greenhouse, using two N (10 mM and 1 mM) treatments and maintained in Hoagland solution. Plants were harvested at the four fully expanded leaves stage. The characteristics of nitrogen absorption efficiency (NAE), nitrogen utilization efficiency (NUE), nitrogen use efficiency (NUE), and the nitrate reductase (NR) and glutamine synthetase (GS) activities showed significant differences at low N doses. NUE and NAE showed significant differences at high N doses. It is concluded that, at high nitrogen, nitrate reductase and glutamine synthetase activities were inadequate and nitrogen absorption efficiency was adequate for discrimination of corn strains and is related to the nitrogen use efficiency. At low nitrogen, the absorption and use efficiency, the lower nitrate reductase activity and the highest glutamine synthetase activity were efficient to discriminate strains for nitrogen use efficiency.

Key-words: Improvement, Abiotic Stress, Nitrogen, Selection, Use Efficiency.

3.1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um dos nutrientes mais exigidos pela cultura do milho, sendo o que mais onera a produção agrícola, pois em grande parte dos solos agricultáveis, este elemento não está disponível em quantidades necessárias para altas produtividades, exigindo aplicações suplementares. Além disso, os cultivares comerciais de milho são altamente dependentes de adubações nitrogenadas, pois o processo de seleção de linhagens endogâmicas para a síntese de híbridos é realizado em ambientes otimizados sem restrição de nitrogênio (ANDREA *et al.*, 2006).

Os cultivares de milho apresentam desempenho diferenciado em relação à fertilização nitrogenada (MIRANDA *et al.*, 2005; FIDELIS *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2008a; 2008b; COIMBRA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008). Com isso, a seleção de genótipos adaptados a condições de baixo suprimento de nitrogênio e mais eficientes no uso de nitrogênio é de grande importância, tanto sob o aspecto econômico quanto por razões ambientais (CHUN *et al.*, 2005), possibilitando maior sustentabilidade de produção (SINGH *et al.*, 2003).

Os alelos responsáveis pelo controle genético da eficiência de uso de nitrogênio foram expressos de acordo com a disponibilidade do nutriente (GALLAIS & HIREL, 2004; SOUZA *et al.*, 2008a; WORKU *et al.*, 2008). A variabilidade genética entre os genótipos para eficiência de uso de nitrogênio é devida à eficiência da utilização de nitrogênio em baixa disponibilidade do nutriente e da sua absorção em alta disponibilidade (GALLAIS & HIREL, 2004; SOUZA *et al.*, 2008a).

Várias características agronômicas e fisiológicas têm sido estudadas em milho para identificar pontos limitantes no controle da absorção, assimilação e remobilização de nitrogênio durante o crescimento e desenvolvimento das plantas (HIREL *et al.*, 2005). Para isso, é necessário que as plantas tenham alta herdabilidade, alta correlação com produção de grãos e variabilidade genética em estresse por nitrogênio (SOUZA *et al.*, 2009).

As características secundárias relacionadas com a eficiência de uso de nitrogênio têm sido utilizadas com intuito de aumentar a eficiência do processo seletivo e, por consequência, do desenvolvimento de cultivares de milho com maior

tolerância ao estresse de nitrogênio, entre elas a atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo do nitrogênio (GALLAIS & HIREL, 2004). A atividade das enzimas nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS) tem sido proposta como critério auxiliar na seleção de cultivares eficientes no uso de nitrogênio (MACHADO *et al.*, 2001; MAJEROWICZ *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2002).

A assimilação de nitrogênio é um processo vital que controla o crescimento e desenvolvimento da planta e envolve, inicialmente, as enzimas NR e nitrito redutase (NiR), que reduzem o nitrato absorvido à forma amoniacal, que, posteriormente, será assimilado nos aminoácidos glutamina, glutamato, asparagina e aspartato, que servem como importantes carreadores do nitrogênio em plantas (TAIZ & ZEIGER, 2004).

A NR é considerada uma das enzimas chave na regulação da disponibilidade de nitrogênio reduzido para o metabolismo das plantas. Vários experimentos foram conduzidos com genótipos de milho para testar a hipótese de se utilizar a atividade dessa enzima como ferramenta auxiliar no desenvolvimento de genótipos mais produtivos, mais responsivos à adubação nitrogenada ou mais eficientes no uso desse nutriente (EICHELBERGER *et al.*, 1989).

A importância da atividade da enzima NR está na possível correlação com o crescimento da planta, produtividade e aumento da eficiência de absorção do nitrogênio pelas plantas em geral e para o milho, em especial, durante o estágio vegetativo. O ensaio *in vivo* da atividade da NR tem sido utilizado como indicador do metabolismo do nitrogênio em plantas. Essa metodologia é considerada a mais adequada para a comparação da atividade dessa enzima entre espécies diferentes ou entre tratamentos distintos (SINGH, 1994).

A GS ocorre em folhas de milho como duas isoformas - uma citoplasmática (GS1) e outra cloroplastídica (GS2) (LEA & AZEVEDO, 2007). Aparentemente, o papel da GS2 é assimilar o amônio gerado a partir da redução do nitrato ou liberado durante o processo de fotorrespiração da glicina (BLACKWELL *et al.*, 1990), enquanto altos níveis de atividade da GS1 são observados em resposta ao acúmulo de amônio, devido ao processo de degradação de proteínas, em plantas senescentes (SAKAKIBARA *et al.*, 1992), ou por deficiência de nitrogênio.

A GS desempenha um papel importante na assimilação e reciclagem de nitrogênio. Esta enzima ocupa uma posição central no metabolismo do nitrogênio

nas plantas, pois é responsável pela assimilação inicial do amônio (MIFLIN & HABASH, 2002). A GS catalisa a incorporação do amônio no glutamato, formando glutamina. A determinação da atividade da enzima GS poderia ser utilizada como um parâmetro auxiliar na seleção de genótipos mais eficientes na assimilação do nitrogênio (MAGALHÃES & HUBER, 1989).

Estudos agronômicos realizados com a cultura do milho têm demonstrado que diversos grupos de genes são diferencialmente expressos em resposta à quantidade de nitrogênio fornecida à planta (SOUZA *et al.*, 2008a; WORKU *et al.*, 2008). A análise das características fisiológicas, como conteúdo de nitrato, atividade das enzimas NR e GS mostraram variação genotípica e correlação positiva entre o conteúdo de nitrato, a atividade da GS, a produção e os seus componentes (BORGES *et al.*, 2006). Assim, o aumento da produtividade em genótipos de milho pode ser atribuído à sua habilidade de acumular nitrato em suas folhas durante o crescimento vegetativo e à eficiência na remobilização do nitrogênio armazenado nos vacúolos durante o enchimento dos grãos (HIREL *et al.*, 2001; COQUE & GALLAIS, 2007).

Estas enzimas apresentam variações genéticas na sua atividade para eficiência no uso de nitrogênio em condições de baixo nitrogênio. Pesquisas, que tiveram como objetivo avaliar a eficiência de uso de nitrogênio em milho, mostraram ser possível detectar variações genéticas e selecionar novos genótipos que mostrem aumento ou diminuição da atividade de várias enzimas envolvidas nas vias de assimilação de nitrogênio (HIREL *et al.*, 2001).

As atividades das enzimas NR e da GS em plantas de milho adequadamente supridas com nitrogênio foram superior em relação às plantas submetidas a estresses por deficiência de nitrogênio (MAJEROWICS *et al.*, 2002).

Acessos de *Arabidopsis* em alto e baixo nitrogênio apresentaram atividades da GS significativamente maiores em plantas cultivadas em baixo nitrogênio comparada à atividade nas plantas em alto nitrogênio e que a atividade aumentava com a senescência foliar, já a atividade da NR foi superior nas plantas em condições de alto nitrogênio (LEMAITRE *et al.*, 2008).

A atividade da NR correlacionou-se negativamente com o conteúdo de nitrato em plantas jovens de milho (GALLAIS & HIREL, 2004). Alta atividade da NR e eficiência na redução de nitrogênio indicam genótipos menos eficientes no uso de

nitrogênio (HIREL *et al.*, 2001). Estas observações são coerentes com a relação negativa entre a atividade da NR e a GS, sugerindo que quando a taxa de redução de nitrato é muito alta, a atividade da GS torna-se limitante para atender ao maior fluxo de nitrogênio reduzido (GALLAIS & HIREL, 2004).

O objetivo desse trabalho foi verificar se a seleção de linhagens de milho para eficiência de uso de nitrogênio pode ser feita pela atividade da nitrato redutase e glutamina sintetase neste grupo de genótipos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado na casa de vegetação do Programa Milho® UFV, Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, MG, durante os meses de março e abril de 2009.

Foram avaliadas, em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, oito linhagens endogâmicas de milho, provenientes do banco de germoplasma do Programa Milho® UFV, que, em experimentos anteriores, foram avaliadas quanto à eficiência de uso de nitrogênio, e duas testemunhas com desempenhos diferenciados em alto e baixo nitrogênio (N).

As linhagens foram semeadas em vasos opacos com volume de 5 dm³, preenchidos com areia lavada. Foram utilizados dois tratamentos de N: alto (10 mM) e baixo N (1 mM). Cinco dias após a emergência das plântulas, iniciou-se o fornecimento de 250 mL vaso⁻¹, a cada dois dias, de solução nutritiva de *Hoagland* modificada.

No estágio de desenvolvimento V4, foram coletadas amostras para as análises das atividades da nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS), feitas sempre entre 7:00 e 8:00 da manhã. Foram retirados discos foliares de oito mm de diâmetro obtidos da terceira folha contada a partir da base da planta, que foram pesados separadamente para as análises enzimáticas.

A determinação da atividade da NR foi feita empregando-se o ensaio *in vivo*. Os discos foliares foram incubados em 10 mL de meio tampão fosfato (KH₂PO₄ e

K_2HPO_4) 0,2 M (pH 7,5), nitrato de potássio 0,25 M, propanol e Triton x 100 10%. Após a imersão, as amostras foram transferidas para o dessecador e submetidas à infiltração a vácuo por um minuto, três vezes, com a finalidade de aumentar a penetração da solução nos tecidos.

Em seguida, os frascos de incubação, envoltos em papel alumínio, foram levados ao banho-maria a 30° C. Nos tempos previamente ajustados de 30 e 60 minutos, foram retiradas alíquotas de um mL, adicionando a cada uma 0,3 mL de sulfanilamida 1%, 0,3 mL de α - naftilenodiamino 0,02 % e 2,4 mL de água.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm, sendo a atividade da NR determinada pela quantidade de nitrito produzida, comparando os valores obtidos com a curva padrão para esse íon, e a atividade foi expressa em μmoles de nitrito por hora por grama de matéria fresca (μmoles de $\text{NO}_2^-/\text{hora}/\text{g}$ matéria fresca).

Para análise da atividade da GS, os discos foram macerados em almofariz contendo meio de extração constituído de tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,9), 2-mercaptoetanol (74 mM) e MgCl_2 (20 mM). O material foi transferido para ependorfs e centrifugado a 10.000 x g, por 30' a 4 °C . Foram adicionados 0,5 mL dos extratos a um meio de reação contendo tampão Tris-HCl (260 mM, pH 7,3), glutamato (500 mM, pH 7,3), MgCl_2 (120 mM), ATP (52 mM) e hidroxilamina (500 mM), com o volume final de 2 mL. Essa mistura foi incubada por 20 min, a 30°C. A reação foi paralisada pela adição de um mL de uma solução contendo cloreto férrico (20 g de ácido tricloroacético, 16 g de cloreto férrico anidro dissolvidos em 24 mL de HCl 0,5 N). Em seguida, a mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 5', obtendo-se o quelato Fe-L-glutamil-g-hidroxamato.

A leitura foi feita a 540nm em espectrofotômetro, utilizando-se o coeficiente de extinção molar do glutamil-hidroxamato ($700 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ou $0,7 \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) como curva padrão para comparação dos resultados lidos no espectrofotômetro. A atividade da GS foi expressa em μmoles de glutamil-hidroxamato (GHD) produzidos por hora por grama de matéria fresca (μmoles GHD/hora/ g matéria fresca).

Após a coleta para as análises enzimáticas, as plantas inteiras foram retiradas dos vasos, separou-se a raiz da parte aérea, e o material vegetal foi seco em estufa a 70 °C até que atingir massa constante. Após a secagem, foram obtidas a matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSRA) e matéria seca total

(MSTo). Pelo método de digestão sulfúrica, foram mensurados os conteúdos de nitrogênio na parte aérea (CNA), na raiz (CNR) e o nitrogênio total (CNT).

A partir das características MSTo, CNT e do nitrogênio aplicado às plantas (NA, g vaso⁻¹), foram calculadas a eficiência de uso de nitrogênio (EUN, massa seca total/ N aplicado), a eficiência de utilização de nitrogênio (EUtN, massa seca total/ conteúdo de N na planta) e a eficiência de absorção de nitrogênio (EAbN, conteúdo de N na planta/ N aplicado), segundo Moll *et al.* (1982).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características eficiência de uso de nitrogênio (EUN) e eficiência de absorção de nitrogênio (EAbN) apresentaram diferenças significativas no alto e no baixo nitrogênio (N), e as características eficiência de utilização de N (EUtN) e as atividades das enzimas nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS) apresentaram diferenças significativas somente no baixo N (TABELA 3.1).

TABELA 3.1 - Resumo das análises de variância das características eficiência de uso de nitrogênio (EUN), eficiência de utilização (EUtN), eficiência de absorção (EAbN) e atividades da nitrato redutase (NR, $\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ matéria fresca (MF)) e glutamina sintetase (GS, $\mu\text{moles de GHD h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ MF) em linhagens de milho, em alto e baixo nitrogênio (N)

Alto N						
Quadrados Médios						
FV	GL	EUN	EUtN	EAbN	NR	GS
Tratamentos	9	19,4058**	10,7799ns	0,0363**	0,2410 ns	8,8507ns
Resíduo	20	3,6889	7,1534	0,0063	0,3009	5,951
Média		6,98	24,31	0,28	1,184	12,33
CV (%)		27	11	27	46	19
Baixo N						
Quadrados Médios						
FV	GL	EUN	EUtN	EAbN	NR	GS
Tratamentos	9	729,5991**	105,3796**	0,1982**	0,1183*	39,8625**
Resíduo	20	97,8913	24,6745	0,0368	0,0359	6,9199
Média		42,6	44,8	0,926	0,38	13,48
CV (%)		23	11	20	49	19

*, ** significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente; ^{ns} não significativo.

A significância da EAbN nos dois ambientes demonstrou a existência de variabilidade entre as linhagens de milho. A capacidade de rápida absorção e o acúmulo de nitrato, na fase inicial de crescimento, pode propiciar o maior estoque de N disponível para o metabolismo das plantas nas fases posteriores de seu ciclo, principalmente no enchimento dos grãos (GALLAIS & HIREL, 2004). Desse modo, a maior eficiência de absorção de nitrato, a partir de baixas concentrações na solução externa, pode ser uma indicação de adaptação às condições de estresse nutricional (COQUE & GALLAIS, 2007). Isso demonstrou a importância da absorção tanto em alto como em baixo N e a importância da maior eficiência metabólica em baixo N.

A EUtN considera aspectos relacionados à absorção e metabolização deste nutriente, com isso a existência de variabilidade genética para esta característica possibilita a seleção de linhagens mais eficientes na absorção e utilização de N em estresse. As significâncias das EAbN e EUtN em baixo N indicam a importância conjunta da absorção e do metabolismo mais eficiente para aumentar EUN.

A média de EUN, em baixo N, foi aproximadamente seis vezes superior à obtida em alto N (TABELA 3.1). Essa diferença pode ser explicada pela diferença e pelo efeito multiplicativo dos componentes primários (EAbN e EUtN) da EUN entre os ambientes. No entanto, Gallais e Hirel (2004) e Souza *et al.* (2008a), ao trabalharem com EUN em plantas de milho que completaram o ciclo fenológico, observaram que a variabilidade genética para EUN estava em função apenas da diferença na EAbN. Essas diferenças podem ser devidas aos diferentes genótipos utilizados.

Para a EUtN, verificou-se aumento da média em baixo N em 84,3 % em relação à média obtida em alto N (TABELA 3.1). Para a EAbN, o acréscimo da média em baixo N foi de 231%, mostrando que, nessa situação, a EAbN foi o componente de maior importância para incremento na EUN.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Souza *et al.* (2008a), que, ao avaliarem combinações híbridas de milho em duas doses contrastantes de N, verificaram que as médias da EUN e seus componentes foram superiores sob estresse. Os resultados também são semelhantes aos obtidos por Uribe Larrea *et al.* (2007), que, ao avaliarem híbridos de milho em seis doses de N, verificaram que a EUN, a EUtN e a EAbN foram negativamente relacionadas com a disponibilidade de

nitrogênio. Esses resultados sugerem que o desempenho de plantas jovens quanto à absorção, utilização e uso de N seja semelhante ao de plantas adultas.

Em alto N, a atividade da NR não apresentou diferença significativa, apesar de a atividade média da NR ($1,18 \mu\text{moles de NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$) ter sido aproximadamente três vezes maior que no baixo N ($0,38 \mu\text{moles de NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$) (TABELA 3.1). Em baixo N, a atividade da NR apresentou diferença significativa entre as linhagens de milho. A atividade da NR é regulada positivamente pela disponibilidade de nitrato, e a expressão dessa enzima, mesmo em condições de baixas concentrações de nitrogênio, é devida ao fato de a mesma se caracterizar como carregadora constitutiva de alta afinidade (LEA & AZEVEDO, 2007).

Para atividade da GS, apenas em baixo N foi observada diferença significativa entre as linhagens de milho. As atividades médias da GS em alto N ($12,33 \mu\text{moles de GHD h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$) e em baixo N ($13,48 \mu\text{moles de GHD h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$) foram muito próximas, isso pode ser devido à atividade da GS1 ter aumentado em função do acúmulo de amônio devido ao processo de degradação de proteínas em plantas senescentes (SAKAKIBARA *et al.*, 1992), compensando a diminuição na atividade da GS2. Por outro lado, sem estresse de N pode ter havido aumento na atividade da GS2, que está relacionado à assimilação de amônio gerado a partir da redução do nitrato (MIFLIN & HABASH, 2002). Há evidências revelando que, para os cereais, a isoforma GS1 é a enzima chave na mobilização do N das folhas senescentes (ANDREWS *et al.*, 2004).

O papel da GS1 durante a remobilização de nitrogênio foi destaque em híbridos de milho contendo menores quantidades de nitrato, sugerindo a participação ativa da GS citosólica durante a reciclagem do nitrogênio proteico (PURCINO *et al.*, 1998).

Para EUN, em alto N, a média geral foi de 6,98, variando de 1,98 a 9,90 (TABELA 3.2). Em baixo N, a média foi 42,60, oscilando de 12,54 a 66,84. Esses resultados confirmam o encontrado por outros autores, quanto menor a disponibilidade de N, maior é a eficiência de uso da planta (URIBELARREA *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2008a).

Em alto e baixo N, as testemunhas apresentaram as maiores médias de EUN, porém, estatisticamente, no alto N, elas não diferiram das linhagens 08-1823-2, 08-1020-1, 08-1807-2, 08-2923-4 e 08-1812-1. No entanto, em baixo N, apenas a

linhagem 08-1020-1 não diferiu estatisticamente das duas testemunhas. Esses resultados mostraram a importância do vigor híbrido para as testemunhas e a existência de linhagens que apresentaram desempenho superior que poderá ainda ser maximizado ao encontrar outra linhagem com alta capacidade de combinação. Também nota-se que o híbrido BRS 3060 apresenta bom desempenho em baixo N, mas também responde ao incremento da dose de N. Isso ocorre porque nos programas de melhoramento são selecionados híbridos de milho que apresentam respostas crescentes na produtividade de grãos à medida que aumenta a disponibilidade de insumos, principalmente nitrogênio.

TABELA 3.2 - Médias das características eficiência de uso de nitrogênio (EUN), eficiência de utilização (EUN), eficiência de absorção (EAbN) e atividades da nitrato redutase (NR, $\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ matéria fresca (MF)) e glutamina sintetase (GS, $\mu\text{moles de GHD h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ MF) em alto e baixo nitrogênio (N)

Tratamentos	Alto N					Baixo N				
	EUN	EUN	EAbN	NR	GS	EUN	EUN	EAbN	NR	GS
BRS 3060	9,16	21,2	0,438	0,82	12,21	66,84	53,43	1,25	0,15	15,53
UFVM 100	9,9	23,8	0,411	1,55	10,32	56,35	51,45	1,09	0,34	15,56
L 08-1020-1	8,68	24,67	0,356	1,37	12,88	52,49	47,99	1,08	0,45	18,63
L 08-1823-2	9,1	26,5	0,344	0,93	14,33	49,87	45,31	1,11	0,09	18,9
L 08-2923-4	6,86	22,83	0,299	1,64	14,29	47,58	44,23	1,08	0,75	11,94
L 08-1807-2	7,77	26,77	0,288	1,23	11,13	38,5	45,56	0,87	0,42	8,73
L 08-1718-1	5,92	26,41	0,221	0,83	9,13	38,07	42,29	0,9	0,39	9,69
L 08-1812-1	6,74	22,94	0,293	1,14	12,57	37,59	46,25	0,81	0,23	12,18
L 08-2924-4	3,71	22,8	0,165	1,25	13,94	26,15	38,5	0,68	0,39	13,86
L 08-1003-1	1,98	25,09	0,079	1,04	12,52	12,54	33,05	0,38	0,6	9,74
Média	6,98	24,31	0,289	1,18	12,33	42,6	44,8	0,92	0,38	13,48
DMS _{t(5%)}	3,27	4,55	0,135	0,93	4,15	16,85	8,46	0,32	0,32	4,47

A resposta diferenciada de cultivares (linhagens ou híbridos) tem sido constatada na cultura do milho com relação à eficiência de uso de nitrogênio (FIDELIS *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2008a; WORKU *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2009). Essas diferenças no desempenho das progênies com e sem N mostraram que, se o objetivo é obter linhagens para as condições de baixo N, a seleção deve ser realizada nessa condição para aumentar a chance de sucesso com a seleção.

As médias de EUN em alto e baixo N foram de 24,31 e 44,80, respectivamente. Em alto N, os tratamentos com média superior a 22,22 não diferiram do tratamento com melhor desempenho (TABELA 3.2). Não foi observada diferença significativa entre as linhagens e a testemunha UFVM 100. Em baixo N, os tratamentos que apresentaram média de EUN acima de 44,97 não diferiram estatisticamente, esse grupo foi formado pelas testemunhas e pelas linhagens 08-

1020-1, 08-1812-1, 08-1807-2, e 08-1823-2. Assim, observou-se que, em baixo N, o híbrido (BRS 3060) e o cultivar de polinização aberta (UFVM 100) foram superiores e mostraram o vigor híbrido por volta de 20% em relação às linhagens. Por outro lado, em alto N, as linhagens foram superiores ao híbrido e ao cultivar de polinização aberta. Esses resultados indicaram que a estratégia adequada de seleção pode ser direcionada para o comportamento do híbrido e não das linhagens *per se*, devido à provável importância dos efeitos de dominância e ou epistáticos.

Em alto N, para a EAbN, a média foi de 0,289, e as linhagens 08-1020-1 e 08-1823-2 não diferiram estatisticamente da testemunha BRS 3060, que apresentou a maior média. Em baixo N, a média foi 0,92, e as linhagens 08-1823-2, 08-1020-1 e 08-2923-4 não foram estatisticamente diferentes da testemunha BRS 3060. Em alto N, as linhagens 08-1020-1 e 08-1823-2 apresentaram as maiores EAbN, 0,35 e 0,34 respectivamente, e não diferiram estatisticamente das duas testemunhas para EUN, comprovando que é possível a seleção de linhagens EUN com base neste componente. Para EAbN, o melhor desempenho do híbrido caracteriza a possibilidade de heterose para a absorção de nitrogênio, que pode estar relacionada tanto pela maior capacidade de atuação dos carreadores de alta e baixa afinidade pelo nitrogênio ou pelo maior sistema radicular dos híbridos.

Em alto N, as atividades das enzimas NR e GS não foram adequadas para diferenciar os genótipos quanto aos três tipos de eficiência devido à não significância pela análise de variância. Por outro lado, em baixo N, as linhagens apresentaram desempenhos diferentes (TABELA 3.2).

As testemunhas BRS 3060 e UFVM 100 apresentaram EUN superior em baixo N, estes também apresentaram uma baixa atividade da NR (TABELA 3.2), mostrando que a seleção para uma maior EUN também pode selecionar para menor atividade da NR.

Hirel *et al.* (2001) sugerem que, durante a fase vegetativa de crescimento, plantas de milho deveriam manter uma baixa atividade da NR, de maneira que o nitrato acumulado nos vacúolos possa ser posteriormente remobilizado para a produção de grãos. Segundo estes autores, uma alta atividade da NR e eficiência na redução de nitrogênio indicam genótipos menos eficientes no uso de nitrogênio.

Em baixo N, para atividade da GS, foi observado que os tratamentos que apresentaram maiores atividades desta enzima também apresentaram os maiores

valores de EUN - as linhagens 08-1020-1 (52,5) e 08-1823-2 (49,8) e as duas testemunhas, BRS 3060 (66,80) e UFVM 100 (56,3) (TABELA 3.2). Para os componentes da EUN, também foram observados resultados semelhantes, ou seja, estes tratamentos também apresentaram os maiores valores de EUtN e/ou EAbN.

Genótipos eficientes podem ter alta capacidade de incorporar o íon amônio em aminoácidos principalmente por meio das enzimas GS e glutamato sintase (GOGAT). Assim, as maiores atividades dessas enzimas parecem ser parâmetros adequados na indicação da eficiência de assimilação da amônia (MAGALHÃES & HUBER, 1989). A variabilidade genética para a atividade da GS e sua correlação com a EUN foram demonstradas por Hirel *et al.* (2001).

3.4 CONCLUSÕES

- Em alto nitrogênio, a eficiência de absorção de nitrogênio é adequada na discriminação das linhagens de milho e está relacionada com a eficiência de uso de nitrogênio, e as atividades das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase são inadequadas;
- Em baixo nitrogênio, as eficiências de absorção e utilização, a menor atividade da nitrato redutase e a maior atividade da glutamina sintetase são eficientes para discriminar linhagens para eficiência de uso de nitrogênio.

REFERÊNCIAS

ANDREA, K. E. D.; OTEGUI, M. E.; CIRILO, A. G.; EYHÉRABIDE, G. Genotypic variability in morphological and physiological traits among maize inbred lines - nitrogen responses. **Crop Science**, Madison, v.46, p.1266-1276, 2006.

ANDREWS, M.; LEA, P.J.; RAVEN, J.A.; LINDSEY, K. Can genetic manipulation of plant nitrogen assimilation enzymes result in increased crop yield and greater N-use efficiency? An assessment. **Annals of Applied Biology**, [s.l.], v.141, n.1, p.25-40, 2004.

BLACKWELL, R. D., MURRAY, A. J. S.; LEA, P.J. Enzymes of the photorespiratory carbon pathway. **Methods in Plant Biochemistry**, [s.l.], v.3, p.129-144, 1990.

BORGES, E.; A.; FERNANDES, M. S.; LOSS, A.; SILVA, E. E.; SOUZA, S. R. Acúmulo e remobilização de nitrogênio em variedades de milho. **Caatinga**, [s.l.], v.19, p.278-286, 2006.

CHUN, L.; MI, G.; LI, J.; CHEN, F.; ZHANG, F. Genetic analysis of maize root characteristics in response to low nitrogen stress. **Plant and Soil**, The Hague, v.276, p.369–382, 2005.

COIMBRA, R. R.; MARTINS, E. C. A.; MIRANDA, G. V.; NAOE, L. K.; CARDOSO, E. A.; ARCHANGELO, E. R. Capacidade de combinação de genótipos de milho para solos com baixa fertilidade. **Revista de Ciências Agrárias**, Recife, v.50, p.23-33, 2008.

COQUE, M.; GALLAIS, A. Genetic variation for nitrogen remobilization and postsilking nitrogen uptake in maize recombinant inbred lines: Heritabilities and correlations among traits. **Crop Science**, Madison v.47, p.1787-1796, 2007.

EICHELBERGER, K. D.; LAMBERT, R. J.; BELOW, F. E.; HAGEMAN, R. H. Divergent phenotypic recurrent selection for nitrate reductase activity in maize. I- selection and correlated responses. **Crop Science**, Madison, v.29, p.1393-1397, 1989.

FERREIRA, V. M.; MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; OLIVIEIRA, L. E. M.; PURCINO, A. A. C. Metabolismo de nitrogênio associado à deficiência hídrica e sua recuperação em genótipos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, p.13-17, 2002.

FIDELIS, R. R.; MIRANDA, G. V.; SANTOS, I. C.; GALVÃO, J. C. C.; PELUZIO, J. M.; LIMA, S. O. Fontes de germoplasma de milho para estresse de baixo nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.37, n.3, p.147-153, 2007.

GALLAIS, A.; HIREL, B. An approach to the genetics of nitrogen of use efficiency in maize. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 55, n. 396, p.295-306, 2004.

HIREL, B.; BERTIN, P.; QUILLERÉ, I.; BOURDONCLE, W.; ATTAGNANT, C.; DELLAY, C.; GOUY, A.; CADIOU, S.; RETAILLIAU, C.; FALQUE, M.; GALLAIS, A. Towards a Better Understanding of the Genetic and Physiological Basis for Nitrogen Use Efficiency in Maize. **Plant Physiology**, Sofia, v.125, p.1258-1270, 2001.

HIREL, B., ANDRIEU, B., VALADIER, M.H., RENARD, S., QUILLERE, I., CHELLE, M., POMMEL, B., FOURNIER, C., AND DROUET, J.L. Physiology of maize II: Identification of physiological markers representative of the nitrogen status of maize (*Zea mays*) leaves during grain filling. **Physiol. Plant**, [s.l.], v.124, p.178–188, 2005.

LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Nitrogen use efficiency 2. Amino acid metabolism. **Annals of Applied Biology**, [s.l.], v.151, p.269–275, 2007.

LEMAITRE, T.; GAUFICHON, L.; BOUTET- MERCEY, S.; CHRIST, A.; MASCLAUX-DOUBRESSE, C. Enzymatic and metabolic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana* Wassileskija accession. **Plant Cell Physiol**, [s.l.], v.49, n.7, p.1056-1065, 2008.

MAGALHÃES, J. R.; HUBER, D. M. Growth and ammonium assimilation enzyme activity in response to nitrogen forms and pH control. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.12, n.8, p.985-996, 1989.

MACHADO, A. T.; SODEK, L., FERNANDES, M. S. N-partitioning, nitrate reductase and glutamine synthetase activities in two contrasting varieties of maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.2, p.249-256, 2001.

MAJEROWICZ, N.; PEREIRA, J. M. S.; MEDICI, L. O.; BISON, O.; PEREIRA, M. B.; SANTOS JÚNIOR, U. M. Estudo da eficiência de uso do nitrogênio em variedades locais e melhoradas de milho. **Revista Brasileira Botânica**, [s.l.], v.25, n.2. 129-136, 2002.

MIFLIN, B. J.; HABASH, D. Z. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. **Journal of Experimental Botany**, London, v.53, n.370, p.979–987, 2002.

MIRANDA, G. V.; GODOY, C. L.; SOUZA, L. V.; SANTOS, I. C. Selection of discrepant maize genotypes for nitrogen use efficiency by a chlorophyll meter. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, [s.l.], v.5, p.451-459, 2005.

MOLL, R.H.; KAMPRATH, E.L.; JACKSON, A. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. **Agronomy Journal**, Madison, v. 74, p.562-564, 1982.

PURCINO, A. A. C.; ARELLANO, C.; ATHWAL, G.S.; HUBER, S. C. Nitrate effect on carbon and nitrogen assimilating enzymes of maize hybrids representing seven eras of breeding. **Maydica**, [s.l.], v.43, p.83–94, 1998.

SAKAKIBARA, H., KAWABATA, S., TAKAHASHI, H., HASE, T.; SUGIYAMA, T. Molecular cloning of the family of glutamine synthetase genes from maize: expression of genes for glutamine synthetase and ferredoxin-glutamate synthase in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues. **Plant & Cell Physiology**, [s.l.], v.33, p.49-58, 1992.

SINGH, V. K. Optimum conditions for measurement of nitrate reductase activity in the leaves of blast fibre yielding plants. **Proceedings Natural Academic Science India**, [s.l.], v.64, p.389-398, 1994.

SINGH, S. P.; TERÁM, H.; MUÑOS C. G; OSORNO, J. M; TAKEGAMI, J. C.; THUNG, M. D. T. Low Soil Fertility Tolerance in Landraces and Improved Common Bean Genotypes. **Crop Science**, Madison, v.43, p.110-119, 2003.

SILVA, R. G.; CRUZ, C. D.; MIRANDA, G. V.; GALVÃO, J. C. C.; SILVA, D. G. Adaptabilidade de famílias de meios-irmãos de milho submetidas ao déficit hídrico e baixa disponibilidade de nitrogênio. **Revista Ceres**, [s.l.], v.55, p.344-351, 2008.

SOUZA, L. V.; MIRANDA, G. V.; GALVÃO, J. C. C.; ECKERT, F. R.; MANTOVANI, E. E.; LIMA, R. O.; GUIMARÃES, L. J. M. Genetic control of grain yield and nitrogen use efficiency in tropical maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, p.1517-1523, 2008a.

SOUZA, A. R. R.; MIRANDA, G. V.; PEREIRA, M. G.; SOUZA, L. V.; FERREIRA, P. L. Agronomic performance of white maize landrace in different environmental conditions. **Revista Ceres**, [s.l.], v.55, p.497-503, 2008b.

SOUZA, A. R. R.; MIRANDA, G.V.; PEREIRA, M.G.; SOUZA, L.V. Predicting the genetic gain in the Brazilian white maize landrace. **Ciência Rural**, [s.l.], v.39, p.19-24, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

URIBELARREA, M.; MOOSE, S.P.; BELOW, F.E. Divergent selection for grain protein affects nitrogen use in maize hybrids. **Fields Crops Research**, [s.l.], v.100, p.82-90, 2007.

WORKU, M.; BÄNZIGER, M.; FRIESEN, D.; SCHULTE AUF'M ERLEY, G; HORST, W. J.; VIVEK, B. S. Relative importance of general combining ability and specific combining ability among tropical maize (zea mays l.) inbreds under contrasting nitrogen environments. **Maydica**, [s.l.], v.53, p. 279-288, 2008.

4 EFICIÊNCIA DE USO DE NITROGÊNIO EM MILHO E SUAS RELAÇÕES COM AS ATIVIDADES DAS ENZIMAS NITRATO REDUTASE E GLUTAMINA SINTETASE

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi relacionar a eficiência de uso de nitrogênio e as atividades das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase na seleção de híbridos de milho. Foram avaliados vinte e dois híbridos e três testemunhas em experimentos de vasos com areia, em casa de vegetação, utilizando dois tratamentos de nitrogênio (N) - alto (10 mM) e baixo (1 mM). As plantas foram colhidas no estágio de quatro folhas completamente desenvolvidas. As características significativas em alto N foram matéria seca da parte aérea (MSPA), relação MSPA/ matéria seca de raiz (MSRA) e eficiência de absorção de nitrogênio (EAbN); e em baixo N, foram MSPA, MSRA, matéria seca total (MSTo) e eficiência de uso de nitrogênio (EUN). Concluiu-se que os critérios de seleção para identificar os híbridos de milho com maior eficiência de uso de nitrogênio variam de acordo com a disponibilidade do nutriente; em alto nitrogênio, as maiores eficiências de uso de nitrogênio estão associadas à eficiência de absorção e a pelo menos uma das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase com maior atividade; em baixo nitrogênio, a eficiência de uso de nitrogênio está associada à maior absorção, utilização do nutriente e à menor atividade da nitrato redutase e maior atividade da glutamina sintetase; e a seleção de híbridos com maior eficiência de uso de nitrogênio não é possível ser realizada com base somente na atividade das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase.

Palavras-chave: *Zea mays*, Melhoramento, Nitrogênio, Nitrato Redutase, glutamina sintetase.

NITROGEN USE EFFICIENCY IN CORN AND ITS RELATIONS WITH THE NITRATE REDUCTASE AND GLUTAMINE SYNTHETASE ACTIVITIES

ABSTRACT

The purpose of this study was to compare the nitrogen use efficiency and the nitrate reductase and glutamine synthetase activities in the selection of corn hybrids. Twenty-two hybrids and three witnesses were evaluated in experiments with sand pots in a greenhouse, using two nitrogen (N) doses as treatments, high (10 mM) and low (1 mM). As plantas foram colhidas no estágio de quatro folhas completamente desenvolvidas. Plants were harvested at the four fully expanded leaves. Significant features at high N were air dry matter (ADM), relation ADM/root dry matter (RDM), and nitrogen absorption efficiency (NAE); at low N, they were ADM, RDM, total dry matter (TDM), and nitrogen use efficiency (NUE). It was concluded that the selection criteria to identify corn hybrids with higher nitrogen use efficiency vary, depending on the nutrients availability; at high nitrogen, the highest nitrogen use efficiencies are linked to the absorption efficiency and at least one of nitrate reductase and glutamine synthetase with higher activity; at low nitrogen, the nitrogen use efficiency is associated with higher absorption, nutrient use, reduced nitrate reductase activity, and higher glutamine synthetase activity; The hybrids selection with more nitrogen use efficiency can not be made based only on the nitrate reductase and glutamine synthetase activities.

Key-words: *Zea mays*, Improvement, Nitrogen, Nitrate Reductase, Glutamine Synthetase.

4.1 INTRODUÇÃO

Na maioria dos solos brasileiros onde o milho é cultivado, o nitrogênio não está disponível em quantidades necessárias para altas produtividades, exigindo aplicações suplementares. Nessas áreas, para a obtenção de patamares de elevada produtividade da cultura, há necessidade do aumento dos insumos a serem utilizados, principalmente fertilizantes nitrogenados, o que implicará, no entanto, elevação dos custos de produção, podendo ainda ocasionar a contaminação dos lençóis freáticos com nitrato. Além disso, a interação genótipo x ambiente presente na cultura do milho deve ser maximizada para aumentar a segurança alimentar local e a produção de alimentos em regiões secundárias (DEITOS *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2007; COIMBRA *et al.*, 2009; MIRANDA *et al.*, 2009).

A redução do uso de fertilizantes nitrogenados pode ser alcançada não só pelas eficientes técnicas de cultivo, mas também pelo uso de cultivares que tenham maior eficiência para absorver e utilizar o nitrogênio (MIRANDA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2008). Além disso, os cultivares selecionados em condições ótimas não podem ser utilizados em ambientes com estresses (CECARELLI, 1996; SOUZA *et al.*, 2009), ou os ganhos de seleção não serão maximizados em cada situação (SILVA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2009).

Os cultivares mais eficientes no uso de nitrogênio requerem menores quantidades deste nutriente para produzir economicamente, entretanto, para desenvolvimento de cultivares tolerantes às condições de estresses, é necessária a adoção de métodos que permitam a seleção de genótipos superiores (MIRANDA *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2008). Para que este objetivo seja alcançado, é necessário um melhor entendimento do controle fisiológico, bioquímico e molecular da absorção e assimilação de nitrato (HARRISON *et al.*, 2004).

A detecção e a possibilidade de exploração e de uso das diferenças genotípicas em milho para a eficiência de uso de nitrogênio se apresentam como uma das estratégias viáveis para contornar o problema da pouca disponibilidade desse nutriente no solo (MIRANDA *et al.*, 2005). O uso eficiente de nutrientes pelas plantas está relacionado à eficiência de absorção, no transporte e na utilização de

nutrientes, que variam em função do genótipo e de fatores ambientais (MARSCHNER, 1995).

O comportamento diferencial de genótipos em relação à disponibilidade de nutrientes indica diferentes mecanismos relacionados à eficiência de uso, pois genótipos que interagem diferencialmente com o nutriente mostram que diferentes genes são expressos nos ambientes com maior ou menor disponibilidade do nutriente (COIMBRA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2009; FIDELIS *et al.*, 2009). Os genes que controlam a produtividade em condições de estresses abióticos são diferentes daqueles para condições ótimas (ATLIN & FREY, 1989; SOUZA, 2003).

Várias estratégias podem ser consideradas para aumentar a eficiência de uso de nitrogênio. Uma delas seria o uso de características secundárias no processo de seleção (MIRANDA *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2007). A característica secundária ideal é aquela que possui alta variabilidade genética, alta herdabilidade, esteja correlacionada geneticamente com a produtividade de grãos em estresse, e que seja fácil e rápida de avaliar (BÄNZIGER *et al.*, 1999).

Características como a atividade das enzimas relacionadas à assimilação do nitrogênio (GALLAIS & HIREL, 2004), teor de clorofila no florescimento (MIRANDA *et al.*, 2005) e ao sistema radicular (CHUN *et al.*, 2005) têm sido usadas para auxiliar na avaliação de genótipos mais eficientes no uso de nitrogênio e outros nutrientes.

A assimilação de nitrogênio é um processo vital que controla o crescimento e o desenvolvimento da planta. Uma vez no interior da célula, o nitrato pode ser reduzido, estocado no vacúolo ou translocado para outros órgãos. O primeiro passo na redução é realizado no citossol pela enzima nitrato redutase (NR) produzindo nitrito, que entra nos plastídios (cloroplasto na parte aérea) e é reduzido a NH_4^+ pela nitrito redutase (NiR). O amônio é fixado pelo sistema glutamina sintetase/glutamato sintase (GS/GOGAT) em aminoácidos (glutamina/glutamato), que servem como substrato para reações de transaminação para produzir outros aminoácidos (TISCHNER, 2000).

O crescimento e desenvolvimento do sistema radicular são altamente responsivos ao aumento da disponibilidade de nutriente, especialmente o nitrogênio (PENG *et al.*, 2009). Taiz e Zeiger (2004) relataram que a habilidade das plantas em

obter água e nutrientes está relacionada à sua capacidade de desenvolver um extenso sistema radicular.

Quando a planta está sob estresse de nitrogênio, a taxa de formação de novas folhas é baixa, além disso, a expansão das folhas em crescimento também é comprometida (RADIN & BOYER, 1982), acarretando, como consequência, menor área foliar e menor capacidade de interceptação da radiação solar. A deficiência de nitrogênio, além de reduzir o crescimento, também pode afetar a partição de assimilados entre as diferentes partes da planta, ocasionando um aumento na relação entre a massa seca das raízes e a massa seca da parte aérea (ARAÚJO & MACHADO, 2006).

Assim, o objetivo deste trabalho foi relacionar a eficiência de uso de nitrogênio e as atividades das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase na seleção de híbridos de milho.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado na casa de vegetação do Programa Milho®, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, MG, durante os meses de maio e junho de 2009.

Foram avaliados, em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, vinte e dois híbridos simples experimentais provenientes do Programa Milho® UFV, e as testemunhas UFVM 100, BRS 1010 e BRS 3060. Estes cultivares foram semeados em vasos opacos com volume de 5 dm³, preenchidos com areia lavada, e avaliados em dois tratamentos distintos quanto à disponibilidade de nitrogênio - alta (10 mM) e baixa (1 mM). Cinco dias após a emergência das plântulas, iniciou-se o fornecimento de 250 ml vaso⁻¹, a cada dois dias, de solução nutritiva de *Hoagland* modificada.

No estádio de desenvolvimento V4, foram coletadas as amostras para as análises das atividades da nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS), realizadas sempre entre 7:00 e 8:00 da manhã. Foram retirados discos foliares de

um cm de diâmetro obtidos da terceira folha contada a partir da base da planta, que foram pesados separadamente para as análises.

A determinação da atividade da NR foi feita empregando-se o ensaio *in vivo*. Os discos foliares foram incubados em 10 mL de meio tampão fosfato (KH_2PO_4 e K_2HPO_4) 0,2 M (pH 7,5), nitrato de potássio 0,25 M, propanol e Triton x 100 10%. Após a imersão, as amostras foram transferidas para o dessecador e submetidas à infiltração a vácuo por um minuto, três vezes, com a finalidade de aumentar a penetração da solução nos tecidos.

Em seguida, os frascos de incubação, envoltos em papel alumínio, foram levados ao banho-maria a 30° C. Nos tempos previamente ajustados de 30 e 60 minutos, retiraram-se alíquotas de um mL, adicionando a cada uma 0,3 mL de sulfanilamida 1%, 0,3 mL de α -naftilenodiamino 0,02 % e 2,4 mL de água.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm, sendo a atividade da NR determinada pela quantidade de nitrito produzida comparando os valores obtidos com a curva padrão para esse íon, e a atividade foi expressa em μmoles de nitrito por hora por grama de matéria fresca (μmoles de $\text{NO}_2^-/\text{hora}/\text{g}$ matéria fresca).

Para análise da atividade da GS, os discos foram macerados em almofariz contendo meio de extração constituído de tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,9), 2-mercaptoetanol (74 mM) e MgCl_2 (20 mM). O material foi transferido para ependorfs e centrifugado a 10.000 x g, por 30', a 4 °C . Foram adicionados 0,5 mL dos extratos a um meio de reação contendo tampão Tris-HCl (260 mM, pH 7,3), glutamato (500 mM, pH 7,3), MgCl_2 (120 mM), ATP (52 mM) e hidroxilamina (500 mM), com o volume final de 2 mL. Essa mistura foi incubada, por 20 min, a 30°C. A reação foi paralisada pela adição de um mL de uma solução contendo cloreto férrico (20 g de ácido tricloroacético, 16 g de cloreto férrico anidro dissolvidos em 24 mL de HCl 0,5 N). Em seguida, a mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 5', obtendo-se o quelato Fe-L-glutamil-g-hidroxamato.

A leitura foi feita a 540nm em espectrofotômetro, utilizando-se o coeficiente de extinção molar do glutamil-hidroxamato ($700 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ou $0,7 \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) como curva padrão para comparação dos resultados lidos no espectrofotômetro. A atividade da GS foi expressa em μmoles de glutamil-hidroxamato (GHD) produzidos por hora por grama de matéria fresca (μmoles GHD/hora/ g matéria fresca).

Após a coleta para as análises enzimáticas, as plantas inteiras foram retiradas dos vasos, separou-se a raiz da parte aérea, e o material vegetal foi seco em estufa a 70 °C até atingir massa constante. Após a secagem, foram obtidas a matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSRA) e matéria seca total (MSTo). Pelo método de digestão sulfúrica, foram mensurados os conteúdos de nitrogênio na parte aérea (CNA), na raiz (CNR) e o nitrogênio total (CNT).

A partir das características MSTo, CNT e do nitrogênio aplicado às plantas (NA, g vaso⁻¹), foram calculadas a eficiência de uso de nitrogênio (EUN, massa seca total/ N aplicado), a eficiência de utilização de nitrogênio (EUtN, massa seca total/ conteúdo de N na planta) e a eficiência de absorção de nitrogênio (EAbN, conteúdo de N na planta/ N aplicado), segundo Moll *et al.* (1982).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características matéria seca da parte aérea (MSPA), relação matéria seca da parte aérea/matéria seca da raiz (MSPA/MSRA) e eficiência de absorção de nitrogênio (EAbN) apresentaram diferenças significativas em alto nitrogênio (N) (TABELA 4.1). Por sua vez, as características MSPA, matéria seca da raiz (MSRA), matéria seca total (MSTo) e eficiência de uso de nitrogênio (EUN) apresentaram diferenças significativas em baixo N (TABELA 4.1). Essas diferentes significâncias em alto e baixo N demonstraram que diferentes critérios de seleção devem ser utilizados para discriminar os híbridos de acordo com a disponibilidade do nutriente. Para alto N, deve-se priorizar a EAbN e, em baixo N, a EUN. Também pode ser sugerido que os genes envolvidos são diferenciados de acordo com a disponibilidade de nitrogênio como também foi relatado em milho por Hirel *et al.* (2007), Lea e Azevedo (2007), Coque *et al.* (2008) e Souza *et al.* (2008).

A média da MSPA foi 47% superior em alto N, já a média da MSRA em baixo N foi 35% superior em relação ao alto N (TABELA 4.1). A média da MSPA foi de 2,5 g e 1,7 g e da MSRA foi de 1,7 g e 2,3 g em alto e baixo N, respectivamente. Na presença de estresse mineral, há aumento do sistema radicular da planta no intuito

de sobreviver e/ou manter o crescimento da parte aérea (MARSCHNER, 1995; BRITO, 2009; ROCHA, 2008).

TABELA 4.1 - Resumo das análises de variância das características matéria seca da parte aérea (MSPA, g vaso⁻¹), da raiz (MSRA, g vaso⁻¹) e total (MSTo, g vaso⁻¹), relação matéria seca da parte aérea/matéria seca da raiz (MSPA/MSRA), eficiência de uso de nitrogênio (EUN), eficiência de utilização (EUtN), eficiência de absorção (EAbN) e atividades da nitrato redutase (NR, $\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ matéria fresca (MF)) e glutamina sintetase (GS, $\mu\text{moles de GHD h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ MF) em alto e baixo nitrogênio (N)

Alto N										
Quadrados Médios										
FV	GL	MSPA	MSRA	MSTo	MSPA/ MSRA	EUN	EUtN	EAbN	NR	GS
Tratamento	24	0,96*	0,53 ^{ns}	2,47 ^{ns}	0,28**	12,34 ^{ns}	8,84 ^{ns}	0,009*	1,95 ^{ns}	7,1 ^{ns}
Resíduo	25	0,46	0,31	1,3	0,11	6,7	10,1	0,004	1,2	12,6
Média		2,5	1,7	4,2	1,5	9,4	33,5	0,3	2,5	10,1
CV (%)		27	32	27	21	27	9	23	44	35
Baixo N										
Quadrados Médios										
FV	GL	MSPA	MSRA	MSTo	MSPA/ MSRA	EUN	EUtN	EAbN	NR	GS
Tratamento	24	0,26*	0,50**	1,35**	0,02 ^{ns}	433,0**	607,9 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,20 ^{ns}	28,2 ^{ns}
Resíduo	25	0,12	0,11	0,32	0,02	104,5	603,3	0,02	0,51	14,7
Média		1,7	2,3	4	0,7	71,4	102,7	0,7	1,1	14,6
CV (%)		21	15	14	20	14	23	24	64	26

*, ** significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente; ^{ns} não significativo.

A MSPA foi superior à MSRA em alto N para todos os tratamentos, mostrando que nestas condições a MSPA foi a que mais contribuiu para MSTo (TABELA 4.2), elevando assim a relação MSPA/MSRA. Em baixo N, a MSRA foi superior à MSPA para todos os híbridos, elevando a menor relação MSPA/MSRA (TABELA 4.3).

A diminuição da relação MSPA/MSRA sob estresse pode resultar de um crescimento reduzido da biomassa da parte aérea, com ou sem aumento da biomassa radicular, podendo, assim, ser uma resposta adaptativa apresentada pela planta, maximizando a habilidade em adquirir uma quantidade maior de nitrogênio do solo quando esse elemento se encontra em baixa disponibilidade (CHUN *et al.*, 2005).

Em condições de baixa disponibilidade de N, o crescimento vegetal fica limitado, com isso, as raízes transformam-se em fortes drenos de carboidratos, reduzindo o crescimento da parte aérea e aumentando a razão entre massa da raiz e massa da parte aérea seca (ARAÚJO; MACHADO, 2006).

Assim, a maior MSRA pode ser uma estratégia adequada para a seleção de genótipos em baixo N, desde que se considere a relação MSPA/MSRA, pois plantas que priorizam o desenvolvimento radicular em detrimento da parte aérea não correspondem ao ideótipo de planta em que o interesse agrônomo é a semente.

TABELA 4.2 - Médias das características matéria seca da parte aérea (MSPA, g vaso⁻¹), da raiz (MSRA, g vaso⁻¹) e total (MSTo, g vaso⁻¹), eficiência de uso de nitrogênio (EUN), eficiência de utilização (EUtN), eficiência de absorção (EAbN) e atividades da nitrato redutase (NR, $\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ matéria fresca (MF)) e glutamina sintetase (GS, $\mu\text{moles de GHD h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ MF) em alto N

Tratamentos	MSPA	MSRA	MSTo	EUN	EUtN	EAbN	NR	GS
6	4,25	2,1	6,35	14,17	34,29	0,41	1,62	9,82
BRS 3060	3,15	2,8	5,95	13,28	34,32	0,42	3,1	7,59
2	3,8	2	5,8	12,94	35,12	0,36	3,38	9,55
22	3,15	2,65	5,8	12,94	34,32	0,38	4,89	10,86
15	3,35	2,3	5,65	12,61	33,81	0,37	2,16	10,5
4	3,1	2,5	5,6	12,5	37,28	0,33	1,46	10,66
UFVM 100	2,55	2,35	4,9	10,93	35,55	0,3	3,2	11,09
5	2,85	1,95	4,8	10,71	31,7	0,33	1,77	11,72
8	2,6	1,8	4,4	9,82	34,58	0,28	1,35	10,03
BRS 1010	2,35	2	4,35	9,7	33,36	0,29	3,11	8,65
9	2,09	1,45	4,35	9,7	36,2	0,26	1,95	14,04
7	2,45	1,7	4,15	9,26	36,32	0,24	2,99	5,78
14	2,3	1,8	4,1	9,15	33,24	0,27	1,69	10,86
10	2,7	1,35	4,05	9,04	31,94	0,28	2,34	9,28
19	2,35	1,6	3,95	8,81	31,31	0,28	2,12	9,1
21	2,45	1,4	3,85	8,59	34,12	0,25	4,22	9,71
3	2,4	1,75	3,85	8,59	36,38	0,23	2,9	8,67
18	2,1	1,5	3,6	8,03	33,52	0,24	3,31	8,42
13	1,75	1,45	3,2	7,14	34,24	0,21	1,42	10,95
17	1,8	1,25	3,05	6,8	28,81	0,23	1,08	9,37
11	1,6	1,4	3	6,69	34,65	0,19	1,89	14,23
12	1,95	1	2,95	6,58	33,6	0,19	2,84	11,38
1	1,75	1,2	2,95	6,58	31,07	0,21	1,5	7,88
20	1,45	1,4	2,8	6,36	30,63	0,2	3,17	11,77
16	1,85	0,75	2,6	5,8	30,82	0,19	3,79	11,96
Média	2,5	1,7	4,2	9,4	33,5	0,3	2,5	10,1
DMS _{t(5%)}	1,4	1,14	2,4	5,36	6,57	0,13	2,31	7,33

Quando genótipos de milho foram submetidos à deficiência de N, eles apresentaram redução na massa total e da parte aérea de todos os genótipos, porém, ocorreu aumento da massa radicular na maioria das linhagens e híbridos (CHUN *et al.*, 2005).

Plantas de milho desenvolvidas em doses contrastantes de fósforo (P) apresentaram crescimento superior do sistema radicular em condições de baixo P

(BRITO, 2009). Resultados semelhantes foram encontrados por Rocha (2008) em sorgo, que verificou existir variabilidade genética entre plantas quando cultivadas em baixa disponibilidade de fósforo, sugerindo que diferentes mecanismos de aquisição podem estar atuando nos ambientes de baixa e alta disponibilidade do nutriente. O sistema radicular ideal deve ser aquele em que a planta tenha o menor custo em formá-lo, mas com o maior comprimento possível (LYNCH & HO, 2005).

TABELA 4.3 - Médias das características matéria seca da parte aérea (MSPA, g vaso⁻¹), da raiz (MSRA, g vaso⁻¹) e total (MSTo, g vaso⁻¹), eficiência de uso de nitrogênio (EUN), eficiência de utilização (EUtN), eficiência de absorção (EAbN) e atividades da nitrato redutase (NR, $\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ matéria fresca (MF)) e glutamina sintetase (GS, $\mu\text{moles de GHD h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ MF) em baixo N

Tratamento	MSPA	MSRA	MSTo	EUN	EUtN	EAbN	NR	GS
2	2,5	3,2	5,7	103	107	0,95	0,65	16,75
6	2	3,3	5,3	95	116	0,82	0,53	23,19
BRS 3060	2,1	3,2	5,3	94	112	0,84	0,95	17,64
14	2	3	5	90	172	0,6	1,01	13,91
15	2,4	2,6	5	90	106	0,84	1,24	11,27
10	1,9	2,6	4,5	81	114	0,71	1,11	20,69
5	2	2,5	4,5	81	107	0,76	0,72	16,25
8	1,9	2,6	4,5	80	107	0,75	1,2	15,01
22	1,8	2,6	4,4	79	110	0,73	1	11,02
4	1,8	2,4	4,3	77	86	1,04	1,77	13,13
7	1,7	2,1	3,8	68	104	0,65	0,65	16,56
13	1,5	2,2	3,7	67	98	0,68	1,15	12,91
9	1,7	2	3,7	67	97	0,7	1,3	13,47
18	1,5	2,1	3,6	65	99	0,66	1,3	11,77
11	1,5	2,1	3,6	65	97	0,67	1,57	14,56
BRS 1010	1,2	2,3	3,5	63	104	0,62	1,1	8,67
17	1,5	2	3,5	63	91	0,7	1,25	16,43
19	1,5	1,9	3,4	61	93	0,64	0,77	14,46
1	1,5	1,8	3,3	60	78	0,77	0,78	9,83
16	1,5	1,7	3,3	59	102	0,57	1,71	10,03
3	1,2	2	3,3	59	95	0,61	1,12	23,45
20	1,2	1,9	3,2	57	105	0,54	1,27	13,44
21	1,3	1,7	3,1	55	96	0,57	1,44	12,19
UFVM 100	1,1	1,9	3	54	92	0,57	0,99	15,2
12	1,4	1,4	2,8	50	89	0,57	1,15	13,61
Média	1,7	2,3	4	71,4	103,3	0,7	1,1	14,6
DMS _{t(5%)}	0,74	0,71	1,2	21	49,47	0,34	1,46	7,89

A significância da EAbN e a não-significância para EUtN em alto N mostraram que a EUN, que é função de EAbN x EUtN, pode ser explicada pela variação da capacidade da planta em absorver N como encontrado também por Gallais e Hirel

(2004) em milho. Sendo assim, é possível selecionar genótipos que possuam maior EAbN.

Em alto N, os híbridos de milho com médias de EUN superiores a 10,0 não diferiram do tratamento com melhor desempenho, o híbrido 6 (14,17) (TABELA 4.2) e todos os outros apresentaram os maiores valores de EAbN, e alguns deles apresentaram valores elevados para EUtN. Estes resultados confirmaram que em alto N a EAbN é a característica que mais contribui para a EUN e que, nestas condições, os híbridos com os maiores valores de EAbN correspondem àqueles com maior EUN. Por outro lado, não necessariamente altos valores de EUtN identificaram os genótipos com maiores valores de EUN.

A atividade média da NR foi 127% superior em alto N em relação ao baixo N, e a atividade da GS foi 44,5 % superior em baixo N (TABELA 4.1). No entanto, as atividades dessas enzimas não foram eficientes para discriminar as linhagens em alto e baixo N, devido à não significância da análise de variância (TABELA 4.1). Resultados semelhantes foram encontrados por Machado, Sodek e Fernandes (2001), que observaram superioridade na atividade da NR em alto N e da GS em baixo N em duas variedades de milho, mas que não foi suficiente para diferenciar os genótipos. Por sua vez, Majerowics *et al.* (2002) observaram superioridade da atividade das duas enzimas em alto N, com maior intensidade na atividade da NR, mas também não identificaram diferenças entre os genótipos.

Ao considerar os dez híbridos com maior EUN, somente cinco deles apresentaram as maiores médias para a atividade da NR e apenas dois híbridos não apresentaram as maiores atividades de GS em alto N. Assim, os híbridos com os maiores valores de EUN também estiveram associados a pelo menos uma das enzimas com maior atividade em alto N. Esses resultados confirmaram as conclusões obtidas da análise de variância.

Em baixo N, a EUN foi significativa e a EAbN e a EUtN não o foram, mostrando que a diferença entre a capacidade de absorção e utilização de N dos híbridos e testemunhas não foi possível ser detectada pela análise de variância (TABELA 4.1). No entanto, como a EUN apresenta efeito multiplicativo, este efeito foi detectado pela análise de variância e indicou que tanto os mecanismos de absorção quanto de utilização foram importantes, mas com efeitos menores. No caso de absorção de N em baixo N, a causa da diferença entre os genótipos pode

ser devida à eficiência dos carreadores de alta afinidade ou à eficiência da enzima nitrato redutase (LEA & AZEVEDO, 2007; HIREL *et al.*; 2001). Por sua vez, a utilização de N está associada ao transporte e distribuição dentro da planta e das células, bem como da assimilação bioquímica, fatores estes que variam em função do genótipo e de fatores ambientais, que, em conjunto ou isoladamente, controlam o desenvolvimento e a produção das plantas (MARSCHNER, 1995). Outra explicação para a não significância da EAbN e EUtN é que o metabolismo de N é autorregulatório, fazendo com que a atividade de uma enzima seja compensada por outra, proporcionando um efeito pequeno para cada enzima *per se* na rota metabólica do nitrogênio.

Segundo Hirel *et al.* (2001), genótipos com baixa atividade da NR e alta atividade da GS são bons indicadores da capacidade de produzir e acumular nitrogênio nos grãos. Estes parâmetros podem ser utilizados para seleção de plantas com alta EUN. Eles sugerem que, durante a fase vegetativa de crescimento, plantas de milho deveriam manter uma baixa atividade da NR, de maneira que o nitrato acumulado nos vacúolos possa ser posteriormente remobilizado para a produção de grãos, e que a alta atividade da NR e eficiência na redução de nitrogênio indicam genótipos menos eficientes no uso de nitrogênio. Com isso, a seleção para a eficiência no uso de nitrogênio depende do desempenho do genótipo nas condições contrastantes de N.

Em baixo N, os híbridos com as maiores médias de EUN também apresentaram as maiores médias de EUtN e EAbN (TABELA 4.3). A EUtN e a EAbN foram importantes para obter maior EUN e estiveram sempre associadas a uma menor atividade da NR e a uma maior atividade da GS (TABELA 4.3). Porém, todos os híbridos superiores para EUN não puderam ser identificados com base na atividade das enzimas.

Os híbridos BRS 3060, 2 e 6 apresentaram os maiores valores de EUN e atividade da NR abaixo da média geral, e para GS, apresentaram atividade acima da média geral (TABELA 4.3). A relação negativa entre a atividade da NR e da GS sugere que, quando a taxa de redução de nitrato é muito alta, a atividade da GS torna-se limitada pelo forte fluxo de nitrogênio reduzido (GALLAIS & HIREL, 2004).

4.4 CONCLUSÕES

- Os critérios de seleção para identificar os híbridos de milho com maior eficiência no uso de nitrogênio variam de acordo com a disponibilidade do nutriente.
- Em alto nitrogênio, as maiores eficiências de uso de nitrogênio estão associadas à eficiência de absorção e a pelo menos uma das enzimas nitrato redutase ou glutamina sintetase com maior atividade;
- Em baixo nitrogênio, a eficiência de uso de nitrogênio está associada a uma maior absorção e utilização do nutriente, menor atividade da nitrato redutase e maior atividade da glutamina sintetase; e
- A seleção de híbridos com maior eficiência do uso de nitrogênio não é possível com base somente na atividade das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A. P.; MACHADO, C. T. T. Fósforo. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição Mineral de Plantas**. 1 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p.253-280.

ATLIN, G. N.; FREY, K. J. Breeding crop varieties for low-input agriculture. **American Journal of Alternative Agriculture**, [s.l.], v.4, n.2, p. 53-58, 1989.

BÄNZIGER, M.; EDMÉADES, G. O.; LAFITTE, H. R. Selection for drought tolerance increases maize yields across a range of nitrogen levels. **Crop Science**, Madison, v.39, p.1035-1040, 1999.

BRITO, C. M. **Variabilidade genética e caracterização do sistema radical de plantas de milho na eficiência de absorção e utilização de fósforo**. 2009. 28f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

CECARELLI, S. Adaptation to low/high input cultivation. **Euphytica Journal**, [s.l.], v.92, n^{os} 1-2, p. 203-214, 1996.

CHUN, L.; MI, G.; LI, J.; CHEN, F.; ZHANG, F. Genetic analysis of maize root characteristics in response to low nitrogen stress. **Plant and Soil**, The Hague, v. 276, p.369–382, 2005.

COIMBRA, R. R.; MARTINS, E. C. A.; MIRANDA, G. V.; NAOE, L. K.; CARDOSO, E. A. ; ARCHANGELO, E. R. Capacidade de combinação de genótipos de milho para solos com baixa fertilidade. **Revista de Ciências Agrárias**, Recife, v.50, p.23-33, 2008.

COIMBRA, R. R.; MIRANDA, G. V.; CRUZ, C. D.; SILVA, D. J. H.; ANDRADE, R. V. Development Brazilian Maize Core Collection. **Genetics and Molecular Biology**, [s.l.], v. 32, p.538-545, 2009.

COQUE, M.; MARTIN, A.; VEYRIERAS, J. B. Genetic variation for N-remobilization and postsilking N-uptake in a set of maize recombinant inbred lines. 3. QTL detection and coincidences. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, Berlin / Heidelberg, v.117, n. 5, p.729-747, 2008.

DEITOS, A. ; ARNHOLD, E. ; MIRANDA, G. V. Yield and combining ability of maize cultiars under different ecogeographic conditions. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, [s.l.], v. 6, p. 222-227, 2006.

FIDELIS, R. R.; MIRANDA, G. V.; ERASMO, E. A. L. Seleção de populações base de milho sob alta e baixa dose de fósforo em solo de cerrado. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.39, p.285-293, 2009.

FERREIRA, P. A.; GARCIA, G. O.; NEVES, J. C. L.; MIRANDA, G. V.; SANTOS, D. B. Produção relativa do milho e teores foliares de nitrogênio, fósforo, enxofre e cloro em função da salinidade do solo. **Revista Ciência Agronômica**, [s.l.], v. 38, p. 7-16, 2007.

GALLAIS, A.; HIREL, B. An approach to the genetics of nitrogen of use efficiency in maize. **Journal of Experimental Botany**, London, v.55, n.396, p.295-306, 2004.

HARRISON, J.; HIREL, B.; LIMAMI, A. M. Variation in nitrate uptake and assimilation between two ecotypes of *Lotus japonicus* and their recombinant inbred lines. **Physiologia Plantarum**, [s.l.], v.120, p.124–131, 2004.

HIREL, B.; BERTIN, P.; QUILLERÉ, I.; BOURDONCLE, W.; ATTAGNANT, C.; DELLAY, C.; GOUY, A.; CADIOU, S.; RETAILLIAU, C.; FALQUE, M.; GALLAIS, A. Towards a Better Understanding of the Genetic and Physiological Basis for Nitrogen Use Efficiency in Maize. **Plant Physiology**, Sofia, v.125, p.1258-1270, 2001.

HIREL, B.; LE GOUIS, J.; NEY, B.; GALLAIS, A. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 9, p. 2369-2387, July 2007.

LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Nitrogen use efficiency 2. Amino acid metabolism. **Annals of Applied Biology**, [s.l.], v.151, p.269–275, 2007.

LYNCH, J. P.; HO, M. D. Rhizoeconomics: carbon costs of phosphorus acquisition. **Plant and Soil**, The Hague, v. 269, n. 1-2, p. 45-56, 2005.

MACHADO, A. T.; SODEK, L., FERNANDES, M. S. N-partitioning, nitrate reductase and glutamine synthetase activities in two contrasting varieties of maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.2, p.249-256, 2001.

MAJEROWICZ, N.; PEREIRA, J. M. S.; MEDICI, L. O.; BISON, O.; PEREIRA, M. B.; SANTOS JÚNIOR, U. M. Estudo da eficiência de uso do nitrogênio em variedades locais e melhoradas de milho. **Revista Brasileira Botânica**, [s.l.], v.25, n.2, p.129-136, 2002.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1995, 889 p.

MIRANDA, G. V.; GODOY, C. L.; SOUZA, L. V.; SANTOS, I. C. Selection of discrepant maize genotypes for nitrogen use efficiency by a chlorophyll meter. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, [s.l.], v. 5, p. 451-459, 2005.

MIRANDA, G. V.; SOUZA, L. V.; GALVÃO, J. C. C.; GUIMARÃES, L. J. M.; VAZ DE MELO, A.; SANTOS, I. C. Genetic variability and heterotic groups of Brazilian popcorn populations. **Euphytica Journal**, [s.l.], v. 162, p.431-440, 2008.

MIRANDA, G. V.; SOUZA, L.V.; GUIMARÃES, L. J. M.; NAMORATO, H.; OLIVEIRA, L. R.; SOARES, M. O. Multivariate analyses of genotype x environment interaction of popcorn. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n.1, p. 45-50, 2009.

MOLL, R.H.; KAMPRATH, E.L.; JACKSON, A. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. **Agronomy Journal**, Madison, v. 74, p.562-564, 1982.

PENG, Y.; NIU, J.; PENG, Z.; ZHANG, F.; LI, C. Shoot growth potential drives N uptake in maize plants and correlates with root growth in the soil. **Field Crops Research**, [s.l.], v. 115, n. 1, p. 85-93, 2009.

RADIN, J. W.; BOYER, J. S. Control of leaf expansion by nitrogen nutrition in sunflower plants: role of hydraulic conductivity and turgor. **Plant Physiology**, Rockville, v.69, p.771-775, 1982.

ROCHA, M. C. Caracterização morfofisiológica radicular relacionada aos mecanismos de aquisição de fósforo em sorgo. 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

SANTOS, M. M.; GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V.; FERREIRA, L. R.; MELO, A. V.; FONTANETTI, A. Espaçamento entre fileiras e adubação nitrogenada na cultura do milho. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 29, n.4 p. 527-533, 2007.

SILVA, R. G.; CRUZ, C. D.; MIRANDA, G. V.; GALVÃO, J. C. C.; SILVA, D. G. Adaptabilidade de famílias de meios-irmãos de milho submetidas ao déficit hídrico e baixa disponibilidade de nitrogênio. **Revista Ceres**, [s.l.], v. 55, p. 344-351, 2008.

SOUZA, L. V. **Capacidade de combinação de cultivares de milho sob estresses abióticos**. 2003. 37f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

SOUZA, L. V.; MIRANDA, G. V.; GALVÃO, J. C. C.; ECKERT, F. R.; MANTOVANI, E. E.; LIMA, R. O.; GUIMARÃES, L. J. M. Genetic control of grain yield and nitrogen use efficiency in tropical maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, p. 1517-1523, 2008.

SOUZA, A. R. R.; MIRANDA, G.V.; PEREIRA, M.G.; SOUZA, L.V. Predicting the genetic gain in the Brazilian white maize landrace. **Ciência Rural**, [s.l.], v.39, p.19-24, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant Cell and Environment**, [s.l.], v.23, p.1005-1024, 2000.

5 EFICIÊNCIA DE USO NUTRICIONAL DE HÍBRIDOS DE MILHO COM E SEM ESTRESSE DE NITROGÊNIO

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de uso de nitrogênio e as atividades das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase em híbridos de milho em doses contrastantes de nitrogênio em campo. Foram instalados dois experimentos em campo com as doses nitrogenadas de 120 e 30 kg ha⁻¹, classificadas como alto e baixo nitrogênio (N). Em alto N, as características produtividade de grãos (PG), eficiência de uso de nitrogênio (EUN), eficiência de utilização de nitrogênio (EUtN) e eficiência de absorção de nitrogênio (EAbN) apresentaram diferenças significativas. Em baixo N, nenhuma das características apresentou diferença significativa. As atividades das enzimas nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS) não foram eficientes para discriminar híbridos de milho. Todos os híbridos com EUN superiores também apresentaram valores elevados da EUtN ou da EAbN em alto e baixo N. Verificou-se aumento de 200 % para a EAbN em baixo N em relação ao alto N. A atividade das enzimas NR e GS foram próximas em alto e baixo N. Concluiu-se que existe variabilidade genética para eficiência de uso de nitrogênio entre os híbridos de milho em alto nitrogênio e que a menor atividade da nitrato redutase ou a maior atividade da glutamina sintetase estão relacionadas à eficiência de uso de nitrogênio.

Palavras-chave: *Zea mays*, Melhoramento, Estresse Abiótico, Estresse Mineral.

CORN HYBRIDS NUTRITIONAL USE EFFICIENCY WITH AND WITHOUT NITROGEN STRESS

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the nitrogen use efficiency and the nitrate reductase and glutamine synthetase activities in corn hybrids at nitrogen contrasting doses in the field. Two experiments were established in the field with nitrogen doses of 120 and 30 kg ha⁻¹, classified as high and low nitrogen doses (N). At high N, the characteristics of grains productivity (GP), nitrogen use efficiency (NUE), nitrogen utilization efficiency (NUE), and nitrogen absorption efficiency (NAE) showed significant differences. At low N, none of the characteristics showed significant difference. The nitrate reductase (NR) and glutamine synthetase (GS) activities were not efficient to discriminate corn hybrids. All hybrids with greater NUE also showed elevated values of NUE or NAE at high and low N. An increase of 200% was verified for NAE at low N in relation to high N. The NR and GS enzyme activity were close at high and low N. It was concluded that there is a genetic variability for nitrogen use efficiency among corn hybrids at high-nitrogen doses; and a lowest nitrate reductase activity or the highest glutamine synthetase activity is related to nitrogen use efficiency.

Key-words: *Zea mays*, Improvement, Abiotic Stress, Mineral Stress.

5.1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um dos nutrientes mais exigidos pela cultura do milho, e a capacidade de fornecimento deste nutriente da maioria dos solos brasileiros é muito limitada. Com isso, os fertilizantes nitrogenados são amplamente utilizados visando a aumentar a produtividade. Assim, o estresse causado pela baixa disponibilidade de nitrogênio é um dos mais severos, levando a uma drástica redução da produtividade (BANZIGER *et al.*, 2000).

A eficiência da adubação nitrogenada é baixa, em torno de 50% (GALLAIS & HIREL, 2004; DEUNER *et al.*, 2008), em função de vários processos de perda de nitrogênio como a lixiviação de nitrato, volatilização da amônia, desnitrificação e competição com a microbiota do solo, causando prejuízos ambientais como a contaminação do lençol freático com nitrato.

Devido ao alto custo dos fertilizantes e problemas de poluição ambiental, têm sido desenvolvidas estratégias para reduzir a utilização de fertilizantes nos cultivos agrícolas sem afetar a produtividade (WANG *et al.*, 2001). Desta forma, a identificação e o uso de cultivares tolerantes às deficiências minerais são essenciais para reduzir os custos de produção e minimizar a utilização de insumos agrícolas, possibilitando maior sustentabilidade de produção (SINGH *et al.*, 2003).

A avaliação de genótipos de milho em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio tem mostrado variabilidade genética no germoplasma tropical (MIRANDA *et al.*, 2005; FIDELIS *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2008). Gallais e Hirel (2004), ao avaliarem a eficiência de uso de nitrogênio com e sem estresse de nitrogênio, verificaram que os alelos responsáveis pelo controle genético da eficiência no uso de nitrogênio foram expressos de acordo com o nível de suprimento do nutriente.

Assim, o desenvolvimento de cultivares eficientes no uso de nitrogênio requer seleção em ambientes específicos para permitir a expressão dos alelos favoráveis, que conferem vantagens adaptativas às condições de estresse, possibilitando a identificação e seleção de genótipos superiores quanto às características de absorção e utilização deste nutriente (SOUZA *et al.*, 2008). Além disso, o germoplasma selecionado em condições ótimas (baixo grau de estresse de

ambientes) não se mostra adequado para ser utilizado em condições abióticas de estresse (CECARELLI, 1996; FIDELIS *et al.*, 2007).

A seleção de cultivares mais eficientes no uso de nitrogênio, definida como a produtividade de grãos por unidade de nitrogênio aplicado no solo, e a adoção de práticas agrícolas que reduzam o uso de fertilizantes nitrogenados representam um desafio para os melhoristas e produtores (HIREL *et al.*, 2007).

A eficiência de uso de nitrogênio tem dois componentes primários - a eficiência de absorção e a eficiência de utilização (MOLL *et al.*, 1982). A eficiência de absorção de nitrogênio é obtida pela quantidade de nitrogênio total na planta na maturidade dividida pelo nitrogênio aplicado no solo, e a eficiência de utilização de nitrogênio é dada pela razão entre a produtividade de grãos e o conteúdo de nitrogênio total na planta. Desta forma, a eficiência de uso de nitrogênio é obtida pelo produto entre a eficiência de absorção e a eficiência de utilização de nitrogênio.

Os processos de absorção, remobilização e partição de nitrogênio em plantas influenciam a produtividade, o acúmulo de proteínas e, conseqüentemente, a qualidade dos grãos, entre outros eventos. Tais processos estão diretamente relacionados à atividade das enzimas de assimilação de nitrogênio. Com isso, é necessário um melhor entendimento dos mecanismos relacionados à absorção, assimilação e remobilização do nitrogênio, para o desenvolvimento de variedades mais eficientes na absorção e utilização desse nutriente.

A rota de assimilação do nitrato em plantas superiores envolve dois estágios sequenciais. A conversão do nitrato à amônia é mediada pela nitrato redutase (NR), que reduz nitrato a nitrito, e pela nitrito redutase (NiR), que converte nitrito em amônia. A amônia é fixada pelo sistema GS/GOGAT em aminoácidos (glutamina/glutamato), que servem de substrato às reações de transaminação para produzir todos os outros aminoácidos proteicos (TISCHNER, 2000).

As atividades destas enzimas relacionadas ao metabolismo do nitrogênio vêm sendo utilizadas como critério auxiliar no processo de seleção de cultivares eficientes no uso de nitrogênio (MACHADO *et al.*, 2001; FERREIRA *et al.*, 2002).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de uso de nitrogênio e a atividade das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase em híbridos experimentais de milho em doses contrastantes de nitrogênio em campo.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios de avaliação foram instalados em dezembro de 2008, na Estação Experimental de Coimbra, MG, latitude sul de 20° 50' 30" e longitude oeste de 42° 48' 30", com altitude de 720 metros. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com duas repetições. A parcela experimental foi constituída de duas linhas de cinco metros de comprimento espaçadas em 0,90 metros. As combinações híbridas e testemunhas foram avaliadas em duas doses contrastantes de nitrogênio. Foi utilizado o sistema convencional de preparo solo.

As doses fornecidas foram de 120 e 30 kg ha⁻¹ de N, em alto e baixo N, respectivamente. Os demais tratos culturais foram feitos de acordo com as recomendações técnicas para a cultura do milho.

Foram avaliadas a produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹), que foi corrigida para 13% de umidade, a eficiência de uso de nitrogênio (EUN) e seus componentes primários, a eficiência de utilização (EUtN) e eficiência de absorção (EAbN) de nitrogênio, de acordo com o índice proposto por Moll *et al.* (1982).

$EAbN = \text{Quantidade de N na planta} / \text{N aplicado, (kg kg}^{-1}\text{)},$

$EUtN = \text{Produtividade de grãos} / \text{Quantidade de N na planta, (kg kg}^{-1}\text{)}, \text{ e}$

$EUN = EAbN \times EUtN, \text{ (kg kg}^{-1}\text{)}.$

Para estimar as eficiências, inicialmente foi necessário quantificar os teores e conteúdo de nitrogênio, sendo necessário estimar a matéria seca da parte aérea e massa de grãos. Para isso, após a maturidade fisiológica, três plantas por parcela foram coletadas, e os grãos separados da parte aérea (caule + folhas + palha + sabugo). Em seguida, efetuou-se a pesagem da parte aérea, e uma amostra de 300 gramas foi submetida à secagem em estufa a 70°C até atingir massa constante, obtendo-se, assim a massa seca da parte aérea (MSPA). O mesmo procedimento foi adotado para a massa de grãos. Após a determinação dos teores de N, estimaram-se os conteúdos de N total absorvido por meio da multiplicação dos teores de N pela MSPA e massa de grãos, permitindo, desta forma, calcular a EUN e seus componentes primários. As análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição de Plantas do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa.

Para a determinação das atividades da nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS), foram colhidas as folhas acima e opostas à inserção da espiga superior. Posteriormente, as folhas foram submersas em água com gelo e levadas ao laboratório de Nutrição Mineral de Plantas da UFV. As coletas foram efetuadas entre 7:00 e 8:00 horas aos 60 dias após o plantio.

A determinação da atividade da NR foi feita empregando-se o ensaio *in vivo*. No laboratório, foram retirados discos foliares de oito mm de diâmetro na parte central da folha, que foram incubados em 10 mL de meio tampão fosfato (KH_2PO_4 e K_2HPO_4) 0,2 M (pH 7,5), nitrato de potássio 0,25 M, propanol e Triton x - 100 10%. Após a imersão, as amostras foram transferidas para o dessecador e submetidas à infiltração a vácuo por um minuto, três vezes, com a finalidade de aumentar a penetração da solução nos tecidos.

Em seguida, os frascos de incubação, envoltos em papel alumínio, foram levados ao banho-maria a 30° C. Nos tempos previamente ajustados de 30 e 60 minutos, retiraram-se alíquotas de um mL, adicionando a cada uma 0,3 mL de sulfanilamida 1%, 0,3 mL de α -naftilenodiamino 0,02 % e 2,4 mL de água.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm, sendo a atividade da NR determinada pela quantidade de nitrito produzida comparando os valores obtidos com a curva padrão para esse íon. A atividade da NR foi expressa em μmoles de nitrito por hora por grama de matéria fresca (μmoles de $\text{NO}_2^-/\text{hora}/\text{g}$ matéria fresca).

Para análise da atividade da GS, os discos foliares de oito mm de diâmetro, retirados da parte central da folha, foram macerados em almofariz contendo meio de extração constituído de tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,9), 2-mercaptoetanol (74 mM) e MgCl_2 (20 mM). O material foi transferido para ependorfs e centrifugado a 10.000 x g, por 30' a 4 °C . Foram adicionados 0,5 mL dos extratos a um meio de reação contendo tampão Tris-HCl (260 mM, pH 7,3), glutamato (500 mM, pH 7,3), MgCl_2 (120 mM), ATP (52 mM) e hidroxilamina (500 mM), com o volume final de 2 mL. Essa mistura foi incubada, por 20 min, a 30°C. A reação foi paralisada pela adição de um mL de uma solução contendo cloreto férrico (20 g de ácido tricloroacético, 16 g de cloreto férrico anidro dissolvidos em 24 mL de HCl 0,5 N). Em seguida, a mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 5', obtendo-se o quelato Fe-L-glutamil-g-hidroxamato.

A leitura foi feita a 540nm em espectrofotômetro, utilizando-se o coeficiente de extinção molar do glutamil-hidroxamato ($700 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ou $0,7 \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) como curva padrão para comparação dos resultados lidos no espectrofotômetro. A atividade da GS foi expressa em μmoles de glutamil-hidroxamato (GHD) produzidos por hora por grama de matéria fresca ($\mu\text{moles GHD/hora/ g matéria fresca}$).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em alto N, as combinações híbridas apresentaram diferenças significativas para as características produtividade de grãos (PG, kg ha^{-1}), eficiência de uso de nitrogênio (EUN), eficiência de utilização de nitrogênio (EUtN) e eficiência de absorção de nitrogênio (EAbN), e não significativas para as atividades da nitrato redutase (NR) e da glutamina sintetase (GS). Em baixo N, nenhuma das características apresentou diferença significativa (TABELA 5.1).

Resultados semelhantes foram encontrados por Souza *et al.* (2008), que, ao avaliarem combinações híbridas de milho em alto e baixo N em campo, encontraram diferenças significativas para PG, EUN e EAbN em alto N, e não significativas para PG, EUN, EUtN e EAbN em baixo N. Esses autores não avaliaram as atividades enzimáticas.

As atividades das enzimas NR e GS não foram eficientes para discriminar os tratamentos em alto e baixo N porque as diferenças entre os híbridos não foram significativas (TABELA 5.1). Observou-se que a atividade da NR foi 10,4% maior em alto N do que em baixo N (TABELA 5.1). Estes resultados confirmaram que a NR é uma enzima induzida pelo substrato, e que mesmo em baixo N ocorre sua expressão, devido ao fato de esta ser uma enzima carregadora constitutiva de alta afinidade (LEA & AZEVEDO, 2007).

TABELA 5.1 - Resumo das análises de variância das características produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹), eficiências de uso de nitrogênio (EUN), eficiência de absorção de nitrogênio (EAbN) e de utilização de utilização de (EUtN), atividades da nitrato redutase (NR, µmoles de NO₂⁻ h⁻¹ g⁻¹ matéria fresca (MF)) e glutamina sintetase (GS, µmoles de GHD h⁻¹ g⁻¹ MF) em alto e baixo nitrogênio (N)

Alto N							
Quadrado Médio							
FV	GL	PG	EUN	EUtN	EAbN	NR	GS
Tratamento	24	5790918**	402*	212*	0,388*	3,1 ^{ns}	10,2 ^{ns}
Resíduo	25	2831891	196	100	0,16	2,4	6,8
Média		6484	54	51	1,12	5,3	12,8
CV (%)		25	25	19	35	29	20
Baixo N							
Quadrado Médio							
FV	GL	PG	EUN	EUtN	EAbN	NR	GS
Tratamento	24	4008759 ^{ns}	4454 ^{ns}	151 ^{ns}	1,6 ^{ns}	3,7 ^{ns}	7,9 ^{ns}
Resíduo	25	3089615	3432	130	0,95	2,1	7,9
Média		4701	156	47	3,3	4,8	13,5
CV (%)		37	37	24	29	30	20

*, ** significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente; ^{ns} não significativo.

Em alto N, a média de produtividade de grãos foi de 6484 kg ha⁻¹, e em baixo N foi de 4701 kg ha⁻¹ (TABELA 5.2). Apesar da redução média de 37,9% provocada pelo estresse de nitrogênio, foram obtidas altas médias de produtividade de grãos em ambos os ambientes, o que evidencia o potencial produtivo e adaptativo dos híbridos e testemunhas, possibilitando a identificação e seleção de genótipos superiores.

Fidelis et al. (2005), ao avaliarem diferentes cultivares de milho em alto (120 kg ha⁻¹) e baixo (20 kg ha⁻¹) N, obtiveram médias de produtividade inferiores às encontradas neste experimento, 4551 kg ha⁻¹ em alto N e 2656 kg ha⁻¹ em baixo N.

Entre as testemunhas, os híbridos BRS 3060 e BRS 1010 foram os de maior destaque em alto N, com médias de produtividade de grãos de 9888 e 8906 kg ha⁻¹, respectivamente. Os híbridos 2 e 11 mostraram produtividades semelhantes às das duas testemunhas. Os tratamentos com produtividade média acima de 6256 kg ha⁻¹ não apresentaram diferença significativa do híbrido mais produtivo, sendo esse grupo formado por 13 híbridos (TABELA 5.2).

Todos os híbridos com EUN superiores também apresentaram valores elevados da EUtN e/ou da EAbN em alto N (TABELA 5.2). Isso mostrou que pelo menos um dos dois componentes da EUN estava relacionado com a maior EUN e que ocorreram diferenças entre os híbridos.

Em alto N, os híbridos BRS 3060, BRS 1010, 11 e 17 apresentaram valores elevados de EUN e EAbN, e os híbridos 22, 14, 8 e 13 apresentaram valores elevados de EUN e EUtN. Os híbridos 2, 4 e 18 apresentaram valores elevados de EUN e seus componentes (TABELA 5.2).

Em baixo N, as combinações híbridas 5, 2 e 11 foram as que apresentaram as maiores médias de produtividade e também EUtN e EAbN elevadas (TABELA 5.2) superando as testemunhas BRS 3060 e BRS 1010. Os híbridos 2 e 11 destacaram-se tanto em alto como em baixo N. Os tratamentos com maiores valores de EUN também apresentaram uma elevada EUtN e/ou EAbN, mostrando que, como observado em alto N, um dos dois componentes estava relacionado à maior EUN.

Entres os híbridos com desempenho superior para EUN em baixo N, BRS 3060, BRS 1010, 11, 17 e 6 apresentaram EAbN elevada, enquanto nos híbridos 8 e 14 a EUtN é que foi elevada (TABELA 5.2).

Observou-se que a média de EUN em baixo N foi aproximadamente três vezes superior à obtida em alto N. Em alto N, a média geral foi de 54 e em baixo N, foi de 156 (TABELA 5.2).

A média geral da EUtN em alto N foi de 51, e em baixo N foi de 47 (TABELA 5.2). Esses valores foram muito próximos, sendo superiores apenas em 8,5% em alto N.

Para a EAbN, as médias foram de 1,1 e 3,3 em alto e baixo N, respectivamente, com aumento de 200% em baixo N em relação à média obtida em alto N (TABELA 5.2). Resultados semelhantes foram constatados por Souza *et al.* (2008), que encontraram um acréscimo na EAbN em baixo N de 199 % em relação ao alto N.

TABELA 5.2 - Médias de produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹), eficiência de uso de nitrogênio (EUN), eficiência de absorção nitrogênio (EAbN), eficiência de utilização de nitrogênio (EUtN), atividades da nitrato redutase (NR, µmoles de NO₂⁻ h⁻¹ g⁻¹ matéria fresca (MF)) e glutamina sintetase (GS, µmoles de GHD h⁻¹ g⁻¹ MF), conteúdo (NG, kg ha⁻¹) e teor (TG, dag kg⁻¹) de nitrogênio acumulado nos grãos em alto e baixo nitrogênio (N)

Tratamentos	Alto N								Baixo N							
	PG	EUN	EUtN	EAbN	NR	GS	NG	TG	PG	EUN	EUtN	EAbN	NR	GS	NG	TG
BRS 3060	9888	82	40	2	5,6	10	153,08	1,55	6370	212	36	5	4,7	10	78,46	1,23
BRS 1010	8906	74	40	1,8	7,4	13,7	156,97	1,78	5309	176	39	4,3	7	16,7	78,57	1,48
11	8761	73	45	1,6	6,8	14,3	143,36	1,66	6500	216	46	4,6	4,7	15,5	94,47	1,47
2	8755	72	65	1,1	4,5	10,7	106,19	1,22	7194	239	60	3,9	7,6	15	80,54	1,11
22	7762	64	61	1	7,1	9,1	97,09	1,24	3956	131	48	2,8	6,1	11,4	51,53	1,31
14	7573	63	61	1	5,3	9,7	92,39	1,22	5188	172	66	2,6	4,8	13,1	57,93	1,11
4	7347	61	51	1,2	5,5	12,5	92,36	1,18	4458	148	44	3,5	4,6	14,2	59,36	1,32
18	7126	59	54	1,1	6,5	10,4	99,56	1,39	5684	189	51	3,7	4,4	13,5	81,64	1,43
8	7141	59	61	0,9	3,1	15,2	91,61	1,27	5208	173	59	3	3,2	16,3	60,61	1,16
17	7074	58	36	1,6	5	13,1	105,57	1,46	6342	211	45	4,8	7	12,1	91,57	1,44
13	6977	58	60	0,9	5	15	86,12	1,2	5073	169	41	4,2	4,4	15,2	67,59	1,32
6	6892	57	43	1,3	4,5	15,4	90,4	1,32	5512	183	43	4,2	4,4	11,5	72,54	1,33
10	6568	54	47	1,1	5,7	16,5	107,12	1,62	4066	135	39	3,5	3,6	14,5	59,66	1,44
20	6597	54	30	2,2	7	12,7	73,77	1,12	4625	154	55	2,6	7,6	14	44,33	0,94
7	6419	53	62	0,8	2,8	9	78,09	1,2	4764	158	57	2,8	3,5	13,8	58,53	1,23
UFVM 100	6051	50	45	1,1	6,4	11	84	1,48	4302	143	48	3	6,2	14,7	60,55	1,38
15	5693	47	50	0,9	5,6	10,1	91,37	1,51	4317	143	41	3,5	4,7	15,4	61,4	1,44
3	5707	47	59	0,8	5,6	13	73,07	1,27	4551	151	53	2,8	4	12	65,35	1,43
5	5549	46	54	0,8	5	14,2	73,14	1,33	7346	244	61	4	4,7	11,6	83,64	1,12
12	5128	42	44	0,9	6	16,4	92,9	1,78	2759	92	35	2,9	4,1	13,2	40,86	1,48
9	5097	42	68	0,7	4,5	13,5	51,28	0,93	2688	89	43	2	4	11,3	41,56	1,53
1	4471	37	52	0,7	3,2	12,8	62,9	1,41	2366	79	40	1,9	3,1	11,5	35,19	1,5
21	4035	33	42	0,8	6,4	13,6	71,65	1,78	2833	94	36	2,5	4,6	11	48,36	1,7
19	3446	28	60	0,5	3,9	14	37,29	1,05	2931	97	50	1,9	2,8	18,3	37,11	1,26
16	3140	26	37	0,7	5,6	15	57,17	1,78	3184	106	39	2,7	5,3	14,9	57,05	1,79
Média	6484	54	51	1,1	5,3	12,8	90,74	1,39	4701	156	47	3,3	4,8	13,5	62,73	1,36
DMSt ₋₅ (%)	3632	30	20	0,8	3,7	8,4			3547	118	23	1,9	3,2	6,7		

Para atividade das enzimas NR e GS, observou-se que os maiores valores de EUN estão relacionados à maior atividade de uma das enzimas, tanto em alto como em baixo N (TABELA 5.2). Em alto N, os híbridos BRS 3060 e 18 apresentaram alta atividade da NR e baixa atividade da GS, enquanto os híbridos 5, 17, 6 e 8 apresentaram baixa atividade da NR e alta atividade da GS. Em baixo N, os híbridos 11 e 18 apresentaram alta atividade da GS e baixa atividade da NR, enquanto o híbrido 17 apresentou alta atividade da NR e baixa atividade da GS. Foram observados também tratamentos com elevada atividade das duas enzimas, os híbridos BRS 1010 e 11 em alto N e os híbridos BRS 1010 e 2 em baixo N.

A atividade da NR nas testemunhas apresentou pequena redução em baixo N em relação ao alto N. As atividades da GS nas testemunhas UFVM 100 e BRS 1010 foram, respectivamente, 33,5 e 21,9 % superiores em baixo N em relação ao alto N (TABELA 5.2).

Estudos com o milho têm revelado que existem coincidências entre QTLs para produtividade e peso de grãos e QTLs para a atividade da GS, sugerindo que esta enzima exerce importante papel sobre a determinação da produção de grãos (HIREL *et al.*, 2001). Há fortes evidências de que a GS é uma enzima chave na mobilização de N a partir de folhas senescentes e que sua atividade está relacionada à produção (ANDREWS *et al.*, 2004).

É fundamental que os híbridos de milho que apresentem maior EUN sejam aqueles que também possuem o maior conteúdo ou teor de nitrogênio nos grãos porque a EUN tem que estar associada ao maior conteúdo de proteína no grão por hectare. Dessa forma, observou-se que os híbridos 2 e 11 apresentaram elevados conteúdos de N no grão por hectare, tanto em baixo quanto em alto N (TABELA 5.2). O híbrido 11 apresentou o maior conteúdo de N no grão em baixo N, sendo 20,5% superior ao BRS 3060. Os maiores teores de nitrogênio não estão associados aos maiores valores de EUN, tanto em baixo quanto em alto N. Esses resultados demonstraram que foi possível selecionar genótipos de milho com maior eficiência nutricional e maior conteúdo de N nos grãos, não sendo, portanto, excluídos os dois tipos de seleção.

5.4 CONCLUSÕES

- Existe variabilidade genética entre os híbridos de milho em alto nitrogênio em campo;
- Pelo menos uma das eficiências, de utilização ou de absorção, está relacionada com a maior eficiência de uso de nitrogênio em alto nitrogênio;
- Pelo menos uma das eficiências, de utilização ou de absorção, está relacionada com a maior eficiência de uso de nitrogênio em baixo nitrogênio;
- A menor atividade da nitrato redutase ou a maior atividade da glutamina sintetase está relacionada à eficiência de uso de nitrogênio; e
- Em baixo nitrogênio, é possível selecionar genótipos de milho com maior eficiência nutricional e maior conteúdo de nitrogênio nos grãos.

REFERÊNCIAS

ANDREWS, M.; LEA, P.J.; RAVEN, J.A.; LINDSEY, K. Can genetic manipulation of plant nitrogen assimilation enzymes result in increased crop yield and greater N-use efficiency? An assessment. **Annals of Applied Biology**, [s.l.], v.141, n.1, p.25-40, 2004.

BANZIGER, M.; EDMENDES, G. O.; BECK, E. D.; BELLON, M. **Breeding for drought and nitrogen stress tolerance in maize from theory to practice**. Mexico, D.F: CIMMYT, 2000. 68 p

CECARELLI, S. Adaptation to low/high input cultivation. **Euphytica Journal**, [s.l.], v. 92, n. 1 - 2, p. 203-214, 1996.

DEUNER, S.; NASCIMENTO, R.; FERREIRA, L. S.; BADINELLI, P. G.; KERBER, R. S. A. Adubação foliar e via solo nitrogênio em plantas de milho em fase inicial de desenvolvimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1359-1365, 2008.

FERREIRA, V. M.; MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; OLIVEIRA, L. E. M.; PURCINO, A. A. C. Metabolismo de nitrogênio associado à deficiência hídrica e sua recuperação em genótipos de milho. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 32, p.13-17, 2002.

FIDELIS, R. R.; MIRANDA, G. V.; SANTOS, I. C.; GALVÃO, J. C. C. Metodologias de seleção de cultivares de milho para eficiência de absorção e de utilização de nitrogênio. **Revista Ceres**, [s.l.], v. 52, n. 304, p. 987-1002, 2005.

FIDELIS, R. R.; MIRANDA, G. V.; SANTOS, I. C.; GALVÃO, J. C. C.; PELUZIO, J. M.; LIMA, S. O. Fontes de germoplasma de milho para estresse de baixo nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 3, p.147-153, 2007.

GALLAIS, A.; HIREL, B. An approach to the genetics of nitrogen of use efficiency in maize. **Journal of Experimental Botany**, London, v.55, n.396, p.295-306, 2004.

HIREL, B.; BERTIN, P.; QUILLERÉ, I.; BOURDONCLE, W.; ATTAGNANT, C.; DELLAY, C.; GOUY, A.; CADIOU, S.; RETAILLIAU, C.; FALQUE, M.; GALLAIS, A. Towards a Better Understanding of the Genetic and Physiological Basis for Nitrogen Use Efficiency in Maize. **Plant Physiology**, Sofia, v.125, p.1258-1270, 2001.

HIREL, B.; LE GOUIS, J.; NEY, B.; GALLAIS, A. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 9, p. 2369-2387, July 2007.

LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Nitrogen use efficiency 2. Amino acid metabolism. **Annals of Applied Biology**, [s.l.], v.151, p.269-275, 2007.

MACHADO, A. T.; SODEK, L.; FERNANDES, M. S. N-partitioning, nitrate reductase and glutamine synthetase activities in two contrasting varieties of maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.2, p.249-256, 2001.

MIRANDA, G. V.; GODOY, C. L.; GALVÃO, J. C. C.; SANTOS, I. C.; ECKERT, F. R.; SOUZA, L. V. Selection of discrepant maize genotypes for nitrogen use efficiency by a chlorophyll meter. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, [s.l.], v.5, p.451-459, 2005.

MOLL, R.H.; KAMPRATH, E.L.; JACKSON, A. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. **Agronomy Journal**, Madison, v. 74, p.562-564, 1982.

SINGH, S. P.; TERÁM, H.; MUÑOS C. G; OSORNO, J. M; TAKEGAMI, J. C.; THUNG, M. D. T. Low Soil Fertility Tolerance in Landraces and Improved Common Bean Genotypes. **Crop Science**, Madison, v.43, p.110-119, 2003.

SOUZA, L. V.; MIRANDA, G. V.; GALVÃO, J. C. C.; ECKERT, F. R.; MANTOVANI, E. E.; LIMA, R. O.; GUIMARÃES, L. J. M. Genetic control of grain yield and nitrogen use efficiency in tropical maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, p.1517-1523, 2008.

TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant Cell and Environment**, [s.l.], v.23, p.1005-1024, 2000.

WANG, Y.; GARVIN, D. F.; KOCHIAN, L. V. Nitrate-Induced Genes in Tomato Roots. Array Analysis Reveals Novel Genes That May Play a Role in Nitrogen Nutrition. **Plant Physiology**, Rockville, v.127, p.345-359, 2001.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A EUN e EAbN mostraram-se adequadas para avaliar os genótipos tanto em seleção precoce quanto no campo em alto N. No entanto, a EUtN mostrou-se importante em alguns experimentos, mas não em todos, sugerindo valor limitado para a seleção de plantas. Por outro lado, a EAbN das linhagens ou híbridos sempre se mostrou adequada para a seleção de genótipos em baixo e alto N e sempre correlacionada com a EUN. No campo, em condições de baixo N, nem todos os tipos de eficiência nutricional foram adequados para discriminar os genótipos. Tal fato não pode ser atribuído à pouca variabilidade genética dos genótipos, pois eles foram previamente selecionados pelos comportamentos diferenciados em condições contrastantes de nitrogênio. No campo, em baixo N, todas as características foram correlacionadas com a produtividade, mostrando a interdependência e importância de todo o metabolismo do nitrogênio para a composição da produtividade.

A avaliação de híbridos e linhagens em condições contrastantes de nitrogênio em casa de vegetação permitiu detectar diferenças entre os genótipos para EUN em fase precoce de desenvolvimento das plantas; porém, a avaliação da produtividade de grãos é fundamental para assegurar que os genótipos com os maiores valores de EUN correspondem aos genótipos com maiores teores e conteúdos de nitrogênio nos grãos, principalmente em condições de baixo nitrogênio. A seleção precoce de plantas permitiu identificar alguns genótipos com maiores EUN em campo, mas não todos. Por outro lado, todos os genótipos classificados com menores valores de EUN na seleção precoce também apresentaram os menores valores da EUN em campo.

Na seleção precoce de plantas em alto N, a EAbN foi adequada para a discriminação das linhagens de milho e está relacionada com a EUN. Em baixo N, a EAbN e a EUtN estão relacionadas à EUN.

As atividades das enzimas NR e GS foram mais eficientes na discriminação de linhagens do que de híbridos, porém, a seleção para maior EUN não é possível de ser realizada com base somente na atividade destas enzimas. Embora a atividade destas enzimas esteja relacionada com a EUN, a quantificação *per se* da atividade enzimática não é suficiente para identificar os genótipos com maiores valores de EUN porque o metabolismo de nitrogênio interage com outros

metabolismos como o de carbono e o de enxofre, além do fósforo. Em campo, as atividades das enzimas foram inadequadas para diferenciar os genótipos e não podem *per se* identificar os genótipos com maiores valores de EUN ou conteúdo de nitrogênio nos grãos.

Ao comparar o desempenho das linhagens e híbridos de milho, notou-se que os híbridos sempre apresentaram as médias pelo menos 30% superiores em relação às linhagens. Isso pode sugerir efeito de heterose para os diferentes tipos de eficiência nutricional e também para as atividades enzimáticas. Dessa forma, a avaliação da capacidade de combinação das linhagens para essas características relacionadas à EUN é fundamental para a identificação de híbridos superiores e adequados para a agricultura sustentável.