

## Notas Científicas

# Variabilidade genotípica de milho para acumulação de nitrogênio e contribuição da fixação biológica de nitrogênio

Marcio Mattos de Mendonça<sup>(1)</sup>, Segundo Sacramento Urquiaga<sup>(2)</sup> e Veronica Massena Reis<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa (AS-PTA), Rua da Candelária, nº 9, 6º andar, CEP 20091-020 Rio de Janeiro, RJ. E-mail: aspta@aspta.org.br <sup>(2)</sup>Embrapa Agrobiologia, Rod. BR 465, Km 7, Caixa Postal 74.505, CEP 23851-970 Seropédica, RJ. E-mail: urquiaga@cnpab.embrapa.br, veronica@cnpab.embrapa.br

**Resumo** – O objetivo deste trabalho foi comparar nove genótipos de milho, com inoculação de uma mistura de bactérias diazotróficas, quanto ao acúmulo de biomassa e N, por meio da técnica de diluição isotópica do <sup>15</sup>N. O experimento foi conduzido em um tanque de concreto de 120 m<sup>2</sup> e 60 cm de profundidade, preenchido com Argissolo Vermelho-Amarelo. Os genótipos variaram quanto à produção de grãos, matéria seca total e acúmulo de N, mas não houve diferenças no enriquecimento de <sup>15</sup>N, o que demonstra que a produção e o acúmulo de N foram consequência da variabilidade genotípica para extrair N do solo.

**Termos para indexação:** *Azospirillum*, *Zea mays*, bactérias diazotróficas, germoplasma.

## Genotypic variability of maize for nitrogen accumulation and contribution of biological nitrogen fixation

**Abstract** – The aim of this work was to compare nine genotypes of maize inoculated with a mixture of diazotrophic bacteria, and to quantify the contribution of biological nitrogen fixation (BNF). In order to quantify the BNF, isotopic dilution technique was used, in a concrete tank loaded with Ultissol horizon B, labelled with <sup>15</sup>N. Differences were observed between total dry matter, grain production and N accumulation but differences in the enrichment of <sup>15</sup>N were not observed, showing that the productivity and N accumulation were a result of the phenotype variability in extract N from the soil.

**Index terms:** *Azospirillum*, *Zea mays*, diazotrophic bacteria, gemoplasm.

Os fertilizantes nitrogenados representam 75% dos custos da adubação do milho, o que corresponde a cerca de 40% dos custos totais de produção da cultura (Machado et al., 1998). Coelho & França (1995) mostraram que na produtividade de 3,65 Mg ha<sup>-1</sup>, são extraídos 77 kg de N e, na produtividade de 5,8 Mg ha<sup>-1</sup>, a extração de N chega a 100 kg ha<sup>-1</sup>. Uma alternativa para a economia de fertilizante nitrogenado é a fixação biológica de nitrogênio (FBN).

Várias bactérias diazotróficas foram isoladas da cultura de milho, destacando-se as espécies *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*, sendo as espécies mais estudadas as do gênero *Azospirillum* (Reis et al., 2000). Em condições de campo, a utilização de estirpes de *Azospirillum brasilense* aumentou a biomassa seca da parte aérea e de grãos de milho plantado na Argentina e no Brasil

(Fulchieri & Frioni, 1994; Purcino et al., 1996). Estudos sobre inoculação de *Azospirillum* em diferentes gramíneas, entre elas o milho, têm demonstrado que existe potencial para a produção de inoculantes com base nesse microrganismo (Dobbelaere et al., 2001), apesar de o efeito positivo estar mais relacionado à produção de fitormônios do que a FBN.

O objetivo deste trabalho foi comparar nove genótipos de milho, com inoculação de uma mistura de bactérias diazotróficas, quanto à produção de grãos, biomassa da parte aérea e acúmulo de N por meio da técnica de diluição isotópica de <sup>15</sup>N.

Os híbridos de milho avaliados foram BR 201 M, HS 20x22, BR 205 e Dekalb 644. As variedades em estudo foram Sintético Elite, selecionado a partir de linhagens Elite com predomínio da raça Tuxpeño; CMS 08,

denominado Composto Nacional; Sol da Manhã NF, selecionada para solos de baixa fertilidade; Nitrodente; e Catetão, variedade local de polinização aberta com predomínio do germoplasma Cateto. Além do milho, foi plantada uma outra gramínea como controle, não fixador, para quantificar a contribuição da FBN, o *Panicum* spp. (KK 16) (Miranda & Boddey, 1987).

A técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  foi conduzida em um tanque de concreto de 120 m<sup>2</sup> e 0,60 m de profundidade, contendo terra do horizonte B de um Argissolo da série Itaguaí, marcado com  $^{15}\text{N}$ , extraído da área experimental da Embrapa Agrobiologia, como descrito por Urquiaga et al. (1992). As características químicas do solo foram: pH em água, 6,1; Al, 0,0 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Ca, 3,2 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mg, 0,8 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; P, 8,2 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; K, 117 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; N, 0,8 g kg<sup>-1</sup> e C, 2,4 g kg<sup>-1</sup>. Na semeadura, a adubação consistiu da aplicação do equivalente a 50 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 30 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O, além de sulfato de zinco (0,4 kg ha<sup>-1</sup>).

O tanque foi dividido em quatro blocos e as sementes de milho e *Panicum* foram distribuídas em linhas de 3 m espaçadas de 1 m, com 15 plantas por linha. Todas as plantas foram cultivadas com uma mistura de bactérias diazotróficas, das espécies *Azospirillum lipoferum* estirpe S82, *A. amazonense* estirpe Am 76 e *Burkholderia kururiensis* estirpe M 130, feita com utilização de turfa, aplicada diretamente nas sementes de milho (109 ufc g<sup>-1</sup>). As culturas microbianas foram desenvolvidas em erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultivo líquido NFb (Döbereiner et al., 1995), acrescido de 1 g L<sup>-1</sup> de cloreto de amônio, durante 24 a 48 horas, até atingirem a densidade ótica 1 (a 436 nm). A turfa, moída e esterilizada, foi neutralizada com carbonato de cálcio e esterilizada duas vezes a 121°C, em autoclave, com intervalo de 24 horas, e misturada às bactérias diazotróficas, de forma a atingir o valor de 10<sup>9</sup> células por grama de turfa.

Aos 45 dias após a semeadura e novamente aos 80 dias, foram retiradas amostras de raízes, colmos e folhas para a contagem da população de bactérias diazotróficas, com a utilização da técnica de contagem por meio do número mais provável (NMP), conforme Döbereiner et al. (1995). Para isto, foram utilizados meios de cultivo semi-seletivos, semi-sólidos e sem adição de N. Na contagem das bactérias, foi utilizada a tabela de McCrady com três repetições por diluição (Döbereiner et al., 1995). A matéria seca da parte aé-

rea foi determinada depois da secagem do material em estufa com ventilação forçada a 65°C por 72 horas. As amostras foram pesadas e moídas em moinho de bolas com abertura de malha 40 (partículas <0,167 mm).

Os grãos de milho foram secados ao ar até atingir 13% de umidade. Os teores de N foram determinados pelo método semimicro Kjeldahl, destilação e titulação, conforme Bremner & Mulvaney (1982). O conteúdo de N foi determinado na parte aérea e nos grãos, a partir do produto do teor de N (%) pela massa seca (g) e foram efetuadas as devidas transformações de unidades para o equivalente a kg ha<sup>-1</sup>. No final do ciclo reprodutivo, foi determinado o enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  da palha e dos grãos, com o qual foi possível calcular o enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  ponderado da planta inteira. Com esses valores, comparados com os obtidos do controle (*Panicum* spp., KK16), foi possível estimar a contribuição da FBN na nutrição da cultura, conforme Urquiaga et al. (1992). Os testes estatísticos (análise de variância e testes de médias) foram realizados por meio do programa MSTAT C (Michigan State University). As médias foram comparadas, utilizando-se o teste Tukey, a 5% de probabilidade.

As avaliações do estabelecimento e colonização das três estirpes de bactérias diazotróficas inoculadas nas plantas de milho foram realizadas aos 54 e 80 dias. Foi observado que as bactérias localizam-se frequentemente nas raízes, seguidas pelos colmos e folhas. Ocorreu aumento na população de bactérias na segunda amostragem (Tabela 1) e o menor número de células de bactérias diazotróficas foi encontrado no híbrido Dekalb 644, nas duas avaliações e nos três meios de cultivo. Machado et al. (1998) utilizaram a estirpe Am76 de *A. amazonense* além de outras espécies de diazotrófos, tais como: *Herbaspirillum seropedicae* (HS136) e *Azospirillum lipoferum* (S82 e CMS22), e observaram correlação positiva entre presença de *A. amazonense* e atividade da enzima glutamina sintetase, principalmente na raiz da 'Sol da Manhã NF'. Quanto ao acúmulo de biomassa, as variedades de milho foram diferentes (Tabela 2). O Dekalb 644 apresentou a menor produção de massa seca da parte aérea (palha), além do menor número de bactérias diazotróficas. Entre os híbridos, a produção média de biomassa seca da palha variou em torno de 3.000 kg ha<sup>-1</sup>, e o rendimento de grãos cerca de 2.000 kg ha<sup>-1</sup>.

Quanto às variedades, o comportamento foi contrário ao observado nos híbridos; a produção média de palha foi maior (cerca de 3.400 kg ha<sup>-1</sup>), e a de grãos me-

nor que a dos híbridos (cerca de 1.300 kg ha<sup>-1</sup>). No caso dos híbridos, a média de rendimento de grãos foi baixa em razão da baixa produtividade do Dekalb 644, que apresentou valores de rendimento similar ao das variedades. Quanto ao acúmulo de N total pela planta, os valores variaram de 22 a 39,50 kg ha<sup>-1</sup>, acompanhando a produção de biomassa da planta inteira (incluindo os grãos), o que reflete o grau de adaptação dos materiais e as condições de solos pobres em N disponível. No entanto, como todos os valores de enriquecimento de <sup>15</sup>N das plantas de milho foram similares

aos da testemunha não fixadora (*Panicum* spp., KK16), pode-se dizer que todos os híbridos e variedades de milho não receberam significativa contribuição da FBN, mesmo quando as bactérias diazotróficas estavam presentes no interior das plantas de milho. Resultados semelhantes foram obtidos em plantas de sorgo e milho (Lee et al., 1994).

Riggs et al. (2001) observaram que os sintomas de deficiência de N não foram atentados por nenhuma das 23 estirpes de bactérias diazotróficas usadas em plantas de milho, tanto em vaso como no campo, mas não mediram a contribuição da FBN. Garcia de Salomone

**Tabela 1.** Bactérias diazotróficas (logaritmo do número de células por grama de matéria fresca) em nove variedades de milho, desenvolvidas em três diferentes meios de cultivo semi-sólido sem nitrogênio, aos 54 e 80 dias após o plantio. Valores médios de quatro repetições<sup>(1)</sup>.

Genótipo	Raízes			Colmos			Folhas		
	JNFB	LGI	JMV	JNFB	LGI	JMV	JNFB	LGI	JMV
54 dias após o plantio									
BR 201 M	5,4	6,1	5,2	4,4	4,3	0,0	0,0	0,0	0,0
HS 20x22	5,6	7,0	3,9	0,0	0,0	0,0	0,0	3,6	0,0
BR 205	5,9	5,2	5,0	5,4	5,4	3,6	5,6	4,4	0,0
Dekalb 644	3,9	4,4	3,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sintético Elite	5,3	5,5	4,6	5,4	5,4	4,4	5,4	5,0	0,0
CMS 08	5,4	6,0	5,2	4,4	5,4	3,9	4,4	5,4	3,6
Sol da Manhã NF	5,6	7,1	5,0	4,4	7,1	0,0	5,0	4,4	0,0
Nitrodente	6,1	7,1	5,0	4,4	4,4	3,6	4,0	4,4	3,6
Catetão	6,0	5,6	4,9	4,6	5,1	0,0	4,4	4,4	3,6
80 dias após o plantio									
BR 201 M	6,8	6,8	>6,8	4,9	5,4	5,2	3,7	3,5	4,9
HS 20x22	>7,1	>7,1	5,8	4,3	3,3	3,3	3,7	3,3	0,0
BR 205	6,9	5,8	>6,9	4,7	4,0	3,3	3,3	3,7	0,0
Dekalb 644	5,6	5,2	3,2	3,3	4,7	0,0	0,0	3,3	0,0
Sintético Elite	6,7	5,6	6,1	4,1	3,8	3,3	4,8	4,7	0,0
CMS 08	7,0	>7,1	5,4	6,7	5,1	7,1	6,7	6,7	6,8
Sol da Manhã NF	6,8	6,8	6,0	4,9	4,0	4,4	4,7	5,8	3,3
Nitrodente	6,9	6,8	4,8	4,2	3,9	0,0	3,6	3,3	0,0
Catetão	6,9	6,2	6,8	4,7	3,6	3,6	5,7	6,7	5,4

<sup>(1)</sup>JNFB, meio semi-seletivo para *Herbaspirillum* sp.; LGI, meio semi-seletivo para *Azospirillum amazonense*; JMV, meio semi-seletivo para *Burkholderia* sp.

**Tabela 2.** Dados agrônômicos e enriquecimento de <sup>15</sup>N de nove genótipos de milho com inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio. Valores médios de quatro repetições<sup>(1)</sup>.

Genótipos	Parte aérea (kg ha <sup>-1</sup> )	Planta inteira (kg ha <sup>-1</sup> )	Grãos (kg ha <sup>-1</sup> )	ICG <sup>(2)</sup> (%)	N acumulado (kg ha <sup>-1</sup> )	ICN <sup>(3)</sup> (%)	<sup>15</sup> N em excesso (%)
BR 201 M	2.270cd	4.116abc	2.104ab	43,67a	28,65ab	65,7a	0,039a
HS 20x22	4.269a	6.251a	2.259a	31,16abc	39,46a	50,6abc	0,036a
BR 205	3.658ab	5.381ab	1.964ab	30,54abc	39,22a	45,2bc	0,038a
Dekalb 644	1.968d	3.201c	1.406abc	38,69ab	22,14b	60,9ab	0,037a
Sintético Elite	2.804bcd	3.998bc	1.361abc	29,92bc	25,50ab	52,3abc	0,036a
CMS 08	4.242a	5.815ab	1.793abc	26,06bc	38,94a	44,4bc	0,036a
Sol da Manhã NF	3.270abcd	4.272abc	1.142bc	22,61c	31,96ab	44,3bc	0,037a
Nitrodente	3.609abc	4.793abc	1.350abc	25,45bc	33,95ab	40,6c	0,037a
Catetão	3.179abcd	3.933bc	870c	19,13c	28,58ab	44,2bc	0,038a
<i>Panicum</i> KK 16	-	-	-	-	-	-	0,037a
CV (%)	17,48	15,65	39,70	-	16,29	-	15,65

<sup>(1)</sup>Em cada coluna, valores seguidos pela mesma letra não são diferentes entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. <sup>(2)</sup>Índice de colheita de grãos (quilograma de grãos por quilograma da planta inteira (parte aérea + grãos)). <sup>(3)</sup>Índice de colheita de nitrogênio (N total nos grãos por N total na planta).

et al. (1996) testaram quatro genótipos quanto à contribuição da FBN, utilizando solo marcado com  $^{15}\text{N}$ . Excetuados os problemas possivelmente originados da estabilização do isótopo no solo, de acordo com os resultados de  $^{15}\text{N}$ , ocorreu contribuição significativa da FBN nos genótipos Dekalb 4D 70 e CMS 22 plantados na Argentina.

As diferenças entre as plantas de milho, em extrair N do solo, somente obedeceram às diferenças dos genótipos na recuperação do N disponível, em que pode haver a participação da biota do solo (micorrizas etc). A própria inoculação das bactérias diazotróficas, que interagem com os genótipos de milho, influenciou o desenvolvimento radicular e a absorção de nutrientes pelas plantas. Os parâmetros índices de colheita de grãos (ICG) e N (ICN) dão idéia da adaptação dos genótipos de milho a solos pobres em N disponível.

O ICG variou de 19 a 44%, e o ICN de 41 a 66%. Os mais altos valores desses parâmetros foram associados com os genótipos de maior rendimento de grãos com menor produção de palha (BR 201 M, Dekalb 644, Sintético Elite e HS 20x22), o que demonstra que são mais eficientes em utilizar o N extraído do solo. Esta é uma característica ecologicamente importante, pois causa menos empobrecimento dos solos, ou maior eficiência na absorção do N, e por isso esses genótipos necessitariam de menor quantidade de fertilizante nitrogenado por unidade de rendimento de grão.

Machado et al. (2001) compararam duas variedades utilizadas neste estudo, Sol da Manhã NF e Catetão, e observaram que a primeira apresentou menor acúmulo de biomassa seca do que a segunda, mas foi capaz de produzir mais grãos, o que mostra diferença na eficiência do uso do N absorvido pelos dois genótipos. Considerando-se que os genótipos de milho se desenvolveram em solo com baixo N total (0,08%) e muito pobre em N mineral disponível, a produção de grãos superior a 1.700 kg ha<sup>-1</sup> dos genótipos HS 20x22, BR 201M, BR 205, CMS 08 pode ser considerada boa, embora não diferindo do Dekalb 644.

As bactérias diazotróficas inoculadas colonizaram raízes, colmos e folhas dos nove genótipos de milho estudados e as maiores populações foram encontradas nas raízes. Os nove genótipos de milho diferiram no rendimento de grãos, produção de biomassa e no acúmulo de N e não foi observada contribuição da fixação biológica de nitrogênio.

## Agradecimentos

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de iniciação científica, ao primeiro autor, e de produtividade em pesquisa, aos demais autores.

## Referências

- BREMNER, J.M.; MULVANEY, C.S. Nitrogen total. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. (Ed.). **Methods of soil analysis: chemical and microbiological properties**. 2<sup>nd</sup> ed. Madison: American Society of Agronomy/Soil Science Society of America, 1982. v.2, p.595-624.
- COELHO, A.M.; FRANÇA, G.E. **Seja o doutor do seu milho: nutrição e adubação**. 2.ed. Piracicaba: Potafos, 1995. 9p.
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, P.; LABANDERAGONZALEZ, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; AGUIRRE, J.F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; BURDMAN, S.; KADOURI, D.; SARIG, S.; OKON, Y. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.871-879, 2001.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1995. 60p.
- FULCHIERI, M.; FRIONI, L. *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): effect on yield in a field experiment in central Argentina. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p.921-923, 1994.
- GARCIA DE SALOMONE, I.E.; DÖBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the  $^{15}\text{N}$  isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v.23, p.249-256, 1996.
- LEE, K. K.; WANI, S.P.; YONEYAMA, T.; TRIMURTULU, N.; HARIKRISHNAN, R. Associative  $\text{N}_2$  fixation in pearl millet and sorghum: levels and response to inoculation. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.40, p.477-484, 1994.
- MACHADO, A.T.; SODEK, L.; DÖBEREINER, J.; REIS, V.M. Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho Nitroflint. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, p.961-970, 1998.
- 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**, v.36, p.249-256, 2001.
- MIRANDA, C.H.B.; BODDEY, R.M. Estimation of biological nitrogen fixation associated with 11 ecotypes of *Panicum maximum* grown in nitrogen 15-labeled soil. **Agronomy Journal**, v.79, p.558-563, 1987.

PURCINO, A.A.C.; PAIVA, E.; SILVA, M.R.; ANDRADE, S.R.M. de. Influence of *Azospirillum* inoculation and nitrogen supply on grain yield, and carbon and nitrogen-assimilating enzymes in maize. **Journal of Plant Nutrition**, v.19, p.1045-1060, 1996.

REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Review in Plant Sciences**, v.19, p.227-247, 2000.

RIGGS, P.J.; CHELIUS, M.K.; INIGUEZ, A.L.; KAEPLER, S.M.; TRIPLETT, E.W. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.829-836, 2001.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen 15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v.56, p.105-114, 1992.

---

Recebido em 27 de outubro de 2005 e aprovado em 19 de setembro de 2006