

## **Atividade Enzimática e sua Relação com a Eficiência no Uso de Nitrogênio em Milho**

Lucimar Rodrigues de Oliveira<sup>1</sup>, Glauco Vieira Miranda<sup>2</sup>, João Carlos Cardoso Galvão<sup>2</sup>,  
Débora Santos Caixeta<sup>3</sup> e Ítalo S. Correia Granato<sup>3</sup>

Universidade Federal de Viçosa, UFV. Viçosa-MG. [lucimaror@yahoo.com.br](mailto:lucimaror@yahoo.com.br), <sup>2</sup> Universidade Federal de Viçosa, UFV. [glaucovmiranda@ufv.br](mailto:glaucovmiranda@ufv.br); [jgalvao@ufv.br](mailto:jgalvao@ufv.br), <sup>3</sup> Universidade Federal de Viçosa (UFV). [deborascaixeta@gmail.com](mailto:deborascaixeta@gmail.com)

**Resumo** – O objetivo deste trabalho foi relacionar a atividade das enzimas glutamina sintetase e nitrato redutase e a eficiência no uso de nitrogênio em linhagens de milho. Foram avaliadas seis linhagens de milho em experimentos de casa de vegetação. Para isto, foram utilizados vasos com areia, e dois níveis de disponibilidade de nitrogênio (N): alto (10 mM) e baixo (1 mM). As plantas foram colhidas no estágio V6 para determinar as atividades da glutamina sintetase (GS) e nitrato redutase (NR), e as eficiências no uso (EUsN), absorção (EAbN) e utilização de nitrogênio (EUtN). As linhagens apresentaram variabilidade para a EUsN tanto em alta como em baixa disponibilidade de N. De acordo com os resultados, em alto N, maiores EUsN estão associadas à maiores EAbN e EUtN. Por outro lado, em baixo N, as maiores EUsN estão associadas a maiores médias de EUtN e a maior atividade da NR. As linhagens apresentaram diferença significativa para NR somente em baixo N. A atividade da NR está relacionada à EUsN e a EUtN em baixo N.

**Palavras-chave:** *Zea mays*, melhoramento, estresse abiótico, seleção.

### **Introdução**

O nitrogênio (N) é considerado um dos principais nutrientes que limitam o crescimento, o desenvolvimento e a produtividade das culturas. Plantas cultivadas em solos pobres em nitrogênio têm crescimento retardado e, conseqüentemente, não expressam o seu potencial produtivo, pois podem ocorrer reduções significativas na taxa fotossintética, um dos principais determinantes do crescimento vegetal (Taiz & Zeiger, 2008).

O comportamento diferencial de genótipos em relação à disponibilidade de N indica que há diferentes mecanismos e genes relacionados à eficiência no uso de nitrogênio (EUN) (Souza et al., 2008). A detecção e a possibilidade de exploração de uso das diferenças genotípicas em milho para a EUN se apresentam como uma das estratégias mais viáveis para contornar o problema da pouca disponibilidade desse nutriente no solo (Miranda et al., 2005). O uso eficiente de N pelas plantas está relacionado à eficiência de absorção (EAbN), no transporte e na utilização (EUtN) deste, sendo que estas variam em função do genótipo e de fatores ambientais (Marschner, 1995).

Várias estratégias podem ser consideradas para aumentar a EUN. Uma delas seria o uso de características secundárias no processo de seleção (Miranda et al., 2005). Características como a atividade das enzimas relacionadas à assimilação do nitrogênio (NR e GS) (Gallais &

Hirel, 2004) têm sido usadas para auxiliar na avaliação de genótipos mais EUN.

A existência de variabilidade genética para a atividade das enzimas NR e GS é relatada em alguns estudos, a qual parece ser em função da disponibilidade de nitrogênio no solo e do genótipo (Gallais & Hirel, 2004; Ervilha et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi identificar as relações das atividades das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase com a seleção de linhagens de milho eficientes no uso de nitrogênio.

### **Material e Métodos**

Foram avaliadas 6 linhagens de milho provenientes do banco de germoplasma do programa de melhoramento de milho da Universidade Federal de Viçosa, Programa Milho®, em casa-de-vegetação em março de 2011. As linhagens avaliadas foram previamente selecionadas no banco de germoplasma deste mesmo programa, por serem contrastantes na eficiência no uso de nitrogênio.

As sementes foram semeadas em bandejas de isopor e após a germinação e a emergência das plântulas, foi transplantada uma plântula de cada linhagem para vasos cilíndricos de PVC com 4 dm<sup>3</sup>. O substrato utilizado foi uma mistura de areia, lavada com água deionizada, e vermiculita, na proporção de 1:1. O fornecimento da solução nutritiva foi feito a cada dois dias a partir do sétimo dia após a emergência das plântulas. A solução nutritiva utilizada foi modificada quanto à concentração de N. Foram utilizados dois níveis de N, 1 mM e 10 mM para baixo e alto N, respectivamente. O experimento foi composto por um fatorial 2 x 6 (dois níveis de N e 6 genótipos de milho) em blocos inteiramente casualizados com quatro repetições. A unidade experimental foi constituída de um vaso.

As plantas foram colhidas no estágio vegetativo de seis folhas completamente expandidas (V6). Próximo a coleta das plantas retirou-se a terceira folha completamente desenvolvida de todas as plantas de cada linhagem, que foram acondicionadas em recipientes com água e gelo e levadas ao laboratório para determinação da atividade da nitrato redutase (NR) por meio de ensaio *in vivo* (Da Matta et al., 1999). Para análise da atividade da glutamina sintetase (GS) foi utilizado o método proposto por Elliott (1953).

O material vegetal, parte aérea e raiz, foram secos em estufa a 70 °C até que a mesma atingisse massa constante. Foram avaliados os seguintes caracteres: peso seco da parte aérea (PPA, g parc<sup>-1</sup>), peso total seco (PTS, g parc<sup>-1</sup>), eficiência de absorção de nitrogênio (EAbN, conteúdo de nitrogênio na planta/ nitrogênio aplicado), eficiência de utilização de nitrogênio

(EUtN, peso total seco/ conteúdo de nitrogênio na planta) e eficiência no uso de nitrogênio (EUsN, peso total seco/ nitrogênio aplicado). As eficiências foram obtidas segundo Moll et al. (1982).

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do Aplicativo Computacional em Genética e Estatística – Programa Genes (Cruz, 2006).

### **Resultados e Discussão**

Na análise conjunta foi verificada existência de variabilidade genotípica entre as linhagens de milho para a eficiência na utilização (EUtN) e no uso (EUsN) de N e para atividade da nitrato redutase (NR) (Tabela 1). Entretanto, para eficiência na absorção de N (EAbN) e atividade da glutamina sintetase (GS) não foi observada variabilidade genotípica significativa.

O efeito de níveis de nitrogênio (N) significativo ( $p < 0,01$ ) demonstrou que o uso de diferentes doses de N para avaliar a resposta de linhagens de milho a adubação nitrogenada foi adequada para reprodução de estresse abiótico para planta (Tabela 1). A interação Linhagens (L) x níveis de N não foi significativa para a EAbN e atividade da enzima glutamina sintetase (GS).

Para as análises de variância individuais, em ambos os níveis de N foi verificada existência de variabilidade genotípica entre as linhagens de milho para EUtN e EUsN (Tabela 2). Entretanto, para EAbN foi observada variabilidade genotípica significativa apenas em alto N.

A significância da EAbN e a não-significância para eficiência de utilização de nitrogênio (EUtN) em alto N mostraram que a EUsN, 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. Com isto, é possível selecionar genótipos que possuam maior EUsN baseado apenas na EAbN.

A atividade média da NR e da GS em alto N, não apresentaram diferença significativa pelo teste t a 5% de probabilidade. A atividade da GS também não apresentou diferença significativa em baixo N (Tabela 2). Neste sentido, as atividades dessas enzimas não foram eficientes para discriminar as linhagens em alto e baixo N. Resultados semelhantes foram encontrados por Machado et al (2001), que observaram superioridade na atividade da NR em alto N em duas variedades de milho, mas que não foi suficiente para diferenciar os genótipos.

Houve boa coincidência entre as linhagens de milho que apresentaram as maiores médias

para EUsN em alto com as que apresentaram as maiores médias em baixo N (Tabela 3). Em alto N observou-se coincidência entre as linhagens que apresentaram maiores médias para EAbN e EUtN com as que tiveram as maiores médias de EUsN. Já em baixo N, as linhagens que apresentaram as maiores médias para EUtN também apresentaram as maiores médias para EUsN.

Isso mostra que o estudo dos componentes da EUsN são importantes na avaliação de genótipos de milho em condições contrastantes, sendo possível identificar genótipos superiores para EUsN através destes componentes para ambiente específico.

De acordo com os resultados encontrados, em baixo nitrogênio, maiores EUsN estão associadas à EUtN, e também a uma maior atividade da NR . Por outro lado, em alto nitrogênio, a EUsN está associada tanto a EAbN como a EUtN.

### **Agradecimentos**

À FAPEMIG, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro e a Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia pelos recursos genéticos e humanos concedidos.

### **Literatura Citada**

Cruz, C. D. Programa Genes: Estatística experimental e matrizes. Editora UFV. Viçosa. 2006. 285p.

DA MATTA F. M., AMARAL J. A. T., RENA A. B. Growth periodicity in trees of *Coffea arabica* L. in relation to nitrogen supply and nitrate reductase activity. **Field Crops Research**. v. 60, p. 223-229, 1999.

ELLIOTT, W. H. Isolation of glutamine synthetase and glutamotransferase from green peas. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 201, p. 661-672, 1953.

Ervilha, J. D. C.; Miranda, G. V.; Oliveira, L. R.; Caixeta, D. S.; Granato, Í. S. C.; Oliveira A. M. C. Atividades Enzimáticas e Eficiência de Uso do Nitrogênio em Linhagens De Milho. in: V Congresso Brasileiro de melhoramento de plantas, 2009. Guarapari. **Anais...** Guarapari: SBMP, 2009.

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

Machado AT, Sodek L, Fernandes MS. N-partitioning, nitrate reductase and glutamine synthetase activities in two contrasting varieties of maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília 36: 249-256, 2001.

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**, v. 5, p. 451-459, 2005.

MOLL RH, KAMPRATH EL, JACKSON A. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. **Agronomy Journal**, Madison, v. 74. 562-564, 1982.

SOUZA LV, MIRANDA GV, GALVÃO JCC, ECKERT FR, MANTOVANI EE, LIMA RO and GUIMARÃES LJM. Genetic control of grain yield nitrogen use efficiency in tropical maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.11, p.1517-1523, 2008.

Taiz, L.; Zeiger, E. **Plant Physiology**. 4th edition, Sinauer Associates, Sunderland, 2006. 764p.

**Tabela 1** - Resumo da análise de variância fatorial para eficiência na absorção (EAbN), na utilização (EUtN) e no uso de N (EUsN) e atividade da nitrato redutase (NR,  $\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ ) e glutamina sintetase (GS,  $\mu\text{moles de GHD h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ ) avaliados em 6 linhagens de milho em dois níveis de N

FV	GL	Quadrados Médios				
		EAbN	EUtN	EUsN	NR	GS
Linhagens (L)	5	0,007 <sup>ns</sup>	747,5 <sup>**</sup>	196,1 <sup>**</sup>	0,17 <sup>**</sup>	3,76 <sup>ns</sup>
Níveis de N (N)	1	1,17 <sup>**</sup>	20489,3 <sup>**</sup>	10632,3 <sup>**</sup>	5,67 <sup>**</sup>	73,38 <sup>**</sup>
L x N	5	0,04 <sup>ns</sup>	733,7 <sup>**</sup>	133,2 <sup>**</sup>	0,10 <sup>*</sup>	1,29 <sup>ns</sup>
Resíduo	36	0,01	55,4	39,5	0,04	2,94
Média Geral		0,33	52,6	20,3	0,51	10,75
CV(%)		30,5	14,1	30,8	41,8	15,9

\*\* , \* , ns Significativo a 1%, a 5% de probabilidade e não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

**Tabela 2** - Resumo da análise de variância individual para eficiência na absorção (EAbN), na utilização (EUtN) e no uso de N (EUsN) e atividade das enzimas nitrato redutase (NR,  $\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$ ) e glutamina sintetase (GS,  $\mu\text{moles GGH g}^{-1} \text{ MF min}^{-1}$ ) avaliados em 6 linhagens de milho em dois níveis de N

Quadrados Médios						
Alto N						
FV	GL	EAbN	EUtN	EUsN	NR	GS
Linhagens	5	0,003 <sup>**</sup>	18,6 <sup>**</sup>	3,6 <sup>**</sup>	0,21 <sup>ns</sup>	2,42 <sup>ns</sup>
Resíduo	18					
Média		0,17	31,95	5,49	0,86	11,9
CV(%)		14,78	6,32	15,00	32,20	14,90
Baixo N						
Linhagens	5	0,008 <sup>ns</sup>	1462,6 <sup>**</sup>	325,7 <sup>*</sup>	0,06 <sup>*</sup>	2,63 <sup>ns</sup>
Resíduo	18					
Média		0,48	73,28	35,25	0,17	9,52
CV(%)		28,72	14,10	25,10	73,93	17,22

\*\* , \* , ns Significativo a 1%, a 5% de probabilidade e não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

**Tabela 3** – Médias de eficiência na absorção (EAbN), na utilização (EUtN) e no uso de N (EUsN) em alto N e de eficiência na utilização (EUtN) e no uso de N (EUsN) e atividade da enzima nitrato redutase (NR,  $\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$ ) em baixo N avaliados em seis linhagens de milho

Linhagens	Alto N			Baixo N		
	EAbN	EUtN	EUsN	EUtN	EUsN	NR
L1	0,12	33,86	4,14	57,78	23,71	0,23
L2	0,18	31,88	5,70	59,65	29,92	0,12
L3	0,17	32,97	5,65	77,34	36,55	0,09
L4	0,16	32,2	5,55	67,84	38,31	0,07
L5	0,17	27,76	4,88	67,41	32,69	0,10
L6	0,21	32,33	7,00	109,64	50,35	0,41
Média	0,17	31,95	5,49	73,28	35,25	0,17
DMS-t <sub>(5%)</sub>	0,03	3,00	1,22	13,35	13,16	0,09