

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**QUALIDADE DE SEMENTES, TEOR DE NITROGÊNIO E
EXPRESSÃO GÊNICA EM GENÓTIPOS DE MILHO
INOCULADOS COM *Azospirillum brasilense***

Lívia de Matos Pereira

Engenheira Agrônoma

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**QUALIDADE DE SEMENTES, TEOR DE NITROGÊNIO E
EXPRESSÃO GÊNICA EM GENÓTIPOS DE MILHO
INOCULADOS COM *Azospirillum brasilense***

Lívia de Matos Pereira

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Vitti Môro

Co-Orientadora: Profa. Dra. Sonia Marli Zingaretti

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2014

P436q Pereira, Livia de Matos
Qualidade de sementes, teor de nitrogênio e expressão gênica em genótipos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense* / Livia de Matos Pereira. – Jaboticabal, 2014
viii, 56 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientador: Gustavo Vitti Môro

Coorientadora: Sonia Marli Zingaretti

Banca examinadora: Rinaldo Cesar de Paula, Everlon Cid Rigobelo, Ivana Marino Bárbaro, Marcelo Marchi Costa

Bibliografia

1. Bactérias diazotróficas 2. Vigor de plântulas 3. Nitrato redutase
4. Glutamina sintetase 5. qPCR I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.15:632.35

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

LÍVIA DE MATOS PEREIRA, nascida em 03 de abril de 1983, na cidade de Lavras, MG, filha de Antônio Alvim Pereira e Elisa de Matos, Engenheira Agrônoma formada na Universidade Federal de Lavras em julho de 2005. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica – PIBIC/CNPq no Departamento de Zootecnia – Forragicultura e Pastagens/UFLA (2003/2004) e bolsista de iniciação científica - PIBIC/FAPEMIG no Departamento de Agricultura – Setor da cultura do milho/UFLA (2005). Obteve o título de mestre em Agronomia (Biotecnologia Vegetal), pela mesma instituição em 2008, com ênfase em mecanismos bioquímicos e moleculares da interação patógeno-hospedeiro e indução de resistência em plantas. Foi Bolsista Mestre de Desenvolvimento Técnico Industrial/CNPq/UFLA, no Departamento de Fitopatologia (2008 - 2010) onde participou de projetos relacionados ao estudo dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra patógenos visando à indução de resistência em plantas e manejo integrado de fitodoenças. Ingressou no curso de doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) em março de 2011 na Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, câmpus de Jaboticabal.

A Deus, minha fortaleza.

Ao meu pai, Antônio Alvim, pela dedicação, incentivo, e amor.

A minha mãe, Elisa, pelo amor, cuidado e apoio.

À minha irmã, Elise, pela fraternidade na vida pessoal e
profissional.

Ao meu marido, Eduardo, pelo amor e companheirismo em todos
os momentos.

Ao meu filho, Caio que está a caminho para motivar minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista, ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) e ao Departamento de Produção Vegetal pela oportunidade de realização do curso.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Gustavo Vitti Môro pela orientação, competência, apoio e por ter acreditado no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Rinaldo Cesar de Paula pela oportunidade, confiança, suporte e ensinamentos, fundamentais para minha formação e para esta conquista.

À Profa. Dra. Sandra Helena Uneda Trevisoli por disponibilizar tão prontamente as estruturas e laboratório.

À Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério, atual coordenadora do Curso de Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pelas contribuições.

À Profa. Sonia Marli Zingaretti pela co-orientação.

Aos membros da banca pela valiosa contribuição.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal, Mônica, Geraldo, Rubens e Sebastião pela amizade, apoio e auxílio na execução dos experimentos.

A Elise pela parceria, ajuda e amizade que foram essenciais para esta conquista.

Aos amigos do “grupo do milho”, especialmente Lucas, Rodolfo, Kauê e Felipe, pelo auxílio, colaboração e amizade desde o início deste trabalho.

Aos colegas e amigos de curso e do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento Vegetal, pela convivência e auxílio, em especial Fabiana e Renata.

Aos professores, pelos conhecimentos transmitidos.

À Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho e Profa. Dra. Heloisa Oliveira dos Santos, da Universidade Federal de Lavras, Laboratório de Análises de Sementes, pela disponibilização do aparelho e laboratório para as análises de PCR Quantitativa em Tempo Real.

A todos que de alguma maneira contribuíram para realização de mais esta etapa.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	v
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Milho	2
2.2. Adubação Nitrogenada.....	3
2.3. Bactérias do Gênero <i>Azospirillum</i>	4
2.4. <i>Expressed Sequence Tags (ESTs)</i> Relacionadas ao Metabolismo do Nitrogênio.....	6
REFERÊNCIAS.....	10
CAPÍTULO 2 – TEORES DE CLOROFILA E NITROGÊNIO FOLIAR E QUALIDADE DE SEMENTES DE MILHO INOCULADAS COM <i>Azospirillum brasilense</i>	14
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	14
INTRODUÇÃO.....	15
MATERIAL E MÉTODOS.....	17
Procedimento Experimental.....	17
Experimento para Análise de Qualidade de Sementes e Vigor de Plântulas.....	17
Experimento para Determinação do Teor de Clorofila e Nitrogênio em Folhas.....	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
Germinação de Sementes e Vigor de Plântulas.....	19
Teor de Clorofila e Nitrogênio em Folhas.....	22
CONCLUSÕES.....	26
REFERÊNCIAS.....	27
CAPÍTULO 3 – EXPRESSÃO QUANTITATIVA DE <i>ESTs</i> RELACIONADAS AO METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM	

GENÓTIPOS DE MILHO INOCULADOS COM <i>Azospirillum brasilense</i>	31
RESUMO.....	31
ABSTRACT.....	31
INTRODUÇÃO.....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	35
Procedimento Experimental.....	35
Bioensaio de Casa de Vegetação e Coleta das Amostras.....	35
Isolamento de RNA total e Tratamento com DNase I.....	36
Síntese de cDNA.....	38
Análises da Expressão de <i>ESTs</i> em Folhas de Milho por PCR	
Quantitativa em Tempo Real (qPCR)	38
Desenho dos <i>Primers</i>	38
PCR Quantitativa em Tempo Real.....	39
Análise e Validação dos Dados.....	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
Expressão Quantitativa Relativa de <i>ESTs</i>	40
<i>ZmNR</i>	41
<i>ZmGln1-3</i>	45
CONCLUSOES.....	49
REFERÊNCIAS.....	49
CAPÍTULO 4 – COSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
ANEXO 1.....	55

QUALIDADE DE SEMENTES, TEOR DE NITROGÊNIO E EXPRESSÃO GÊNICA EM GENÓTIPOS DE MILHO INOCULADOS COM *Azospirillum brasilense*

RESUMO – O trabalho foi realizado com o objetivo de verificar em quatro genótipos de milho o efeito da inoculação com *Azospirillum brasilense* na resposta germinativa das sementes e crescimento de plântulas, no teor de nitrogênio e índice de conteúdo de clorofila foliar e, na expressão quantitativa relativa de *ESTs* chaves no metabolismo do nitrogênio. Em um primeiro ensaio avaliou-se a qualidade fisiológica de sementes de dois híbridos simples comerciais (AG7098 e 2B707) e duas variedades sintéticas experimentais (V2 e V4) inoculados com *A. brasilense*, por meio de testes de porcentagem de germinação e emergência, índice de velocidade de emergência, massa de matéria seca de parte aérea e raiz. O segundo ensaio foi conduzido em casa de vegetação onde foram cultivados os mesmos quatro genótipos sob diferentes formas de inoculação com *A. brasilense* e fornecimento de N sendo avaliados teor de nitrogênio e clorofila foliar e a expressão de duas *ESTs* que codificam enzimas chaves da rota metabólica do N, a nitrato redutase (*ZmNR*) e a glutamina sintetase (*ZmGln1-3*) por meio da técnica de PCR quantitativa em tempo real. Os genótipos diferem em relação à inoculação com *A. brasilense*. Os híbridos foram responsivos à inoculação com *A. brasilense* para massa de matéria seca de raiz. A variedade V2 apresentou comportamento inferior quanto à massa de matéria seca de raiz, mas respondeu positivamente a massa de matéria seca de parte aérea, e V4 não apresentou diferenças significativas quando inoculada. Os resultados de índice de conteúdo de clorofila não foram significativos. Para teor de nitrogênio foliar cada genótipo respondeu de maneira particular. Em relação a expressão das *ESTs* verificou-se que a inoculação proporcionou incrementos na expressão de *ZmNR* para os híbridos AG7098 e 2B707. A variedade V2 não respondeu a inoculação e V4 apresentou maior nível de expressão quando recebeu somente adubação nitrogenada de cobertura. De maneira geral, as variedades responderam negativamente ou não responderam a inoculação com *A. brasilense*, ao se comparar os genótipos dentro de tratamentos, sendo que V2 apresentou os menores valores de expressão de *ZmRN* para todas as formas de inoculação e fornecimento de N ou não via fertilizante em cobertura. Para os híbridos AG7098 e 2B707 e para variedade V4, a inoculação com *A. brasilense* induziu a expressão de transcritos *ZmGln1-3*. A variedade V2 não respondeu à inoculação quanto a expressão da *EST ZmGln1-3*.

Palavras Chave: bactérias diazotróficas, vigor de plântulas, nitrato redutase, glutamina sintetase, qPCR.

SEED QUALITY, NITROGEN CONTENT AND GENE EXPRESSION IN MAIZE GENOTYPES INOCULATED WITH *Azospirillum brasilense*

ABSTRACT – The objective was to evaluate in maize genotypes the effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* in seed germination response and seedling growth, the nitrogen and chlorophyll leaf content the relative quantitative expression of ESTs keys on nitrogen metabolism. In a first experiment was evaluated the physiological quality of seeds from two single cross hybrids (AG7098 and 2B707) and two synthetic varieties experimental (V2 and V4) inoculated with *A. brasilense*, by germination and emergence percentage, emergence rate tests, dry weight of shoot and root. The second experiment was conducted in a greenhouse where the same genotypes were grown under different forms of inoculation with *A. brasilense* and supplying nitrogen being evaluated nitrogen and chlorophyll leaf content and the expression of two ESTs encoding key enzymes of metabolic pathway for N, nitrate reductase (ZmNR) and glutamine synthetase (ZmGln1-3) using the technique of quantitative real-time PCR. The genotypes differ with respect to inoculation with *A. brasilense*. Hybrids were responsive to inoculation with *A. brasilense* for dry root matter. The V2 variety showed lower performance as the dry weight of root, but responded positively to dry mass of shoots and V4 showed no significant differences when inoculated. The results of chlorophyll content were not significant. To the N content each genotype evaluated responded in a particular way. Regarding the expression of ESTs were found that inoculation promoted increases in expression ZmNR for AG7098 and 2B707 hybrids. A variety V2 did not respond to inoculation and V4 showed higher expression level when received only nitrogen application. In general, the varieties responded negatively or did not respond to inoculation with *A. brasilense*, when comparing the genotypes within treatments, and V2 showed lower expression values ZmRN for all forms of inoculation and fertilizer N supply via. For the hybrid AG7098 and 2B707 and variety V4, inoculation with *A. brasilense* induced the expression of transcripts ZmGln1-3. The V2 variety does not respond to inoculation as the expression of EST ZmGln1-3..

KEY WORDS: diazotrophs, seedling vigor, nitrate reductase, glutamine synthetase, qPCR.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Enzimas chaves envolvidas no metabolismo de nitrogênio. Nitrato Redutase (NR); Nitrito Redutase (NiR); Glutamina Sintetase (GS); Glutamato Sintase (GOGAT); Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN)..... 7

CAPÍTULO 2

- Tabela 1.** Resumo da análise de variância com os quadrados médios e suas respectivas significâncias para germinação (G), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa de matéria seca de raiz (MSR), massa de matéria seca de parte aérea (MSA) em genótipos de milho inoculados com *A. brasilense*..... 20
- Tabela 2.** Porcentagem de emergência e índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de genótipos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense*..... 21
- Tabela 3.** Massa de matéria seca de raiz (MSR) e parte aérea (MSA), em mg por plântula, oriundas de sementes de genótipos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense*..... 21
- Tabela 4.** Resumo da análise de variância para índice de conteúdo de clorofila (ICC) e teor de nitrogênio (TN) na folha submetidos a diferentes formas de inoculação de *Azospirillum brasilense* e fornecimento de fertilizante nitrogenado..... 23
- Tabela 5.** Índice de Conteúdo de Clorofila em folhas de genótipos de milho submetidos a diferentes formas de inoculação de *Azospirillum brasilense* e fornecimento de fertilizante nitrogenado..... 24
- Tabela 6.** Teor de nitrogênio foliar (g kg^{-1}) de genótipos de milho submetidos a diferentes formas de inoculação de *Azospirillum brasilense* e fornecimento de fertilizante nitrogenado..... 24

CAPÍTULO 3

Figura 1.	Perfil de qualidade de RNA total extraído de folhas de milho avaliados em gel de agarose (1,0% m v ⁻¹) corado com brometo de etídeo (10 mg mL ⁻¹).....	37
Tabela 1.	Sequências dos <i>primers</i> e identificação das sequencias moldes.....	39
Figura 2.	Perfil da expressão quantitativa relativa de nitrato redutase (ZmNR) em folhas de milho submetidos a diferentes formas de inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> e fornecimento de fertilizante nitrogenado. 1) Controle, sem inoculação e sem cobertura com N, 2) Inoculação via sementes com <i>A. brasilense</i> sem adubação de cobertura com N, 3) Inoculação via sementes e adubação de cobertura com 100 kg de N ha ⁻¹ , 4) Inoculação via solo sem adubação de cobertura com N, 5) Inoculação via solo e adubação de cobertura com 100 kg de N ha ⁻¹ , 6) Sem inoculação com adubação de cobertura com 100 kg de N ha ⁻¹ . Colunas representam a indução média de transcritos gênicos relativa ao controle, com valores gerados a partir de RNA de réplicas biológicas. Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo Teste Tukey (0,05). Barras representam erro padrão da média.....	42
Figura 3.	Perfil da expressão quantitativa relativa de nitrato redutase (ZmNR) em folhas genótipos de milho dentro dos tratamentos aplicados: 1) Controle, sem inoculação e sem cobertura com N, 2) Inoculação via sementes com <i>A. brasilense</i> sem adubação de cobertura com N, 3) Inoculação via sementes e adubação de cobertura com 100 kg de N ha ⁻¹ , 4) Inoculação via solo sem adubação de cobertura com N, 5) Inoculação via solo e adubação de cobertura com 100 kg de N ha ⁻¹ , 6) Sem inoculação com adubação de cobertura com 100 kg de N ha ⁻¹ . Colunas representam a indução média de transcritos gênicos relativa ao controle, com valores gerados a partir de RNA de réplicas biológicas. Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo Teste Tukey (0,05). Barras representam erro padrão da média.....	44
Figura 4.	Perfil da expressão quantitativa relativa de glutamina sintetase (ZmGln1-3) em folhas de milho submetidos a diferentes formas de inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> e fornecimento de fertilizante nitrogenado. 1) Controle, sem inoculação e sem cobertura com N, 2) Inoculação via sementes com <i>A. brasilense</i> sem adubação de cobertura com N, 3) Inoculação via sementes e adubação de cobertura com 100 kg de N ha ⁻¹ , 4) Inoculação via solo sem adubação	

de cobertura com N, 5) Inoculação via solo e adubação de cobertura com 100 kg de N ha⁻¹, 6) Sem inoculação com adubação de cobertura com 100 kg de N ha⁻¹. Colunas representam a indução média de transcritos gênicos relativa ao controle, com valores gerados a partir de RNA de réplicas biológicas. Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo Teste Tukey (0,05). Barras representam erro padrão da média..... 46

Figura 5. Perfil da expressão quantitativa relativa de glutamina sintetase (ZmGln1-3) em folhas genótipos de milho dentro dos tratamentos aplicados: 1) Controle, sem inoculação e sem cobertura com N, 2) Inoculação via sementes com *A. brasilense* sem adubação de cobertura com N, 3) Inoculação via sementes e adubação de cobertura com 100 kg de N ha⁻¹, 4) Inoculação via solo sem adubação de cobertura com N, 5) Inoculação via solo e adubação de cobertura com 100 kg de N ha⁻¹, 6) Sem inoculação com adubação de cobertura com 100 kg de N ha⁻¹. Colunas representam a indução média de transcritos gênicos relativa ao controle, com valores gerados a partir de RNA de réplicas biológicas. Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo Teste Tukey (0,05). Barras representam erro padrão da média..... 48

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) é destaque na produção mundial de cereais, ocupando o primeiro lugar. Logo, técnicas agrícolas adequadas devem ser disponibilizadas para aumentar a produtividade e a rentabilidade econômica para o produtor (YADAV; YADAV; SIGH, 2011).

Fatores como a fertilidade do solo e o nível tecnológico adotado no uso de insumos afetam diretamente a produção, sendo a produtividade da cultura garantida pela utilização de elevadas quantidades de fertilizantes nitrogenados (MAJEROWICZ et al, 2002).

O nitrogênio é um macronutriente essencial ao crescimento, desenvolvimento e produção das plantas. Por esta razão é o nutriente mais exigido e absorvido pela planta de milho e, conseqüentemente, mais limitante à produção. Entretanto, é fornecido principalmente na forma de adubo químico, um dos principais fatores que oneram o custo de produção das culturas (KOUCHEBAGH; MIRSHEKARI; FARAHVASH, 2012).

Desperdícios e escassez de nitrogênio podem acarretar prejuízos econômicos, ambientais, e até de saúde pública e de segurança alimentar (CARVALHO; VON PINHO; DAVIDE, 2011). A baixa eficiência no uso de fertilizantes nitrogenados faz com que grande parte do N aplicado não seja aproveitada pelas plantas causando contaminação de lençóis freáticos, rios e lagos. O processo de produção de fertilizantes nitrogenados, por sua vez, contribui para o efeito estufa.

Frente a este cenário, a busca por alternativas que reduzam a necessidade de adubação nitrogenada e a busca de uma agricultura sustentável e menos poluente são alvos de diversos estudos, a exemplo da viabilidade da utilização de bactérias fixadoras de nitrogênio, ou capazes de promover o crescimento e o aumento de produtividade em milho.

Em gramíneas, têm sido demonstrados os benefícios promovidos por bactérias diazotróficas em simbiose, por exemplo, *Azospirillum* spp.. Embora ganhos de produtividade em milho já venham sendo verificados, as maneiras que fazem com

que a interação favoreça as plantas ainda não foram totalmente esclarecidas, assim como a especificidade da interação do genótipo da planta com a espécie ou estirpe da bactéria (HUNGRIA, 2011).

Portanto, é crescente a busca pelo melhor entendimento da interação *Azospirillum* spp. x planta, de modo a alcançar a eficiência do uso de bactérias diazotróficas em associação com a cultura do milho.

Diante disso, o trabalho foi realizado com o objetivo de verificar o efeito da inoculação com *Azospirillum brasilense* sobre a qualidade fisiológica das sementes, vigor de plântulas, o teor de clorofila e de nitrogênio foliar, bem como o perfil de expressão de ESTs relacionadas ao metabolismo do nitrogênio em genótipos de milho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas mais praticadas no Brasil e no mundo para fins de alimentação animal, humana e mais recentemente é crescente o incentivo para produção de etanol de milho.

Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento, a safra 2013/14 no país deve atingir cerca de 15 milhões de ha de área plantada, produzindo mais de 75 milhões de toneladas de milho (CONAB, 2014).

A cultura é praticada por todas as classes de produtores, tanto para consumo próprio, no caso de pequenas propriedades, até grandes produtores cuja produção destina-se ao abastecimento do mercado (PAVÃO; FERREIRA FILHO, 2011).

Em nível mundial, o crescimento econômico dos países asiáticos e a produção de etanol nos Estados Unidos têm contribuído para o aumento da demanda pelo produto. No Brasil, por sua vez, o crescimento no setor de carnes, principalmente aves e suínos, estimula o consumo interno do grão (PAVÃO; FERREIRA FILHO, 2011).

Diante disso, o investimento em tecnologias que reduzam o custo de produção, aumentem a produtividade e permitam a expansão agrícola, torna-se

relevante, uma vez que se trata de uma das culturas mais expressivas no país e no mundo, com grande potencial de produção.

2.2. Adubação Nitrogenada

A relevante questão da expansão da fronteira agrícola ligada à necessidade de maior produção de alimentos, demanda a ampliação de sistemas produtivos praticáveis e adaptados aos diferentes tipos de solo.

Neste aspecto, é importante evidenciar a carência nutricional dos solos, principalmente com relação ao nitrogênio (N). Os solos brasileiros não são aptos a fornecer a quantidade de N necessária para assegurar altas produtividades. Ademais, na maioria das vezes as exigências não são supridas pelas adubações químicas (GUIMARÃES, 2006).

A essencialidade e importância do N para as plantas fundamentam-se no fato deste elemento estar presente em moléculas vitais como ácidos nucléicos, fonte de informação genética e proteínas, participando da constituição de enzimas importantes nas rotas metabólicas, ou com funções estruturais e de transporte (NOVOA; LOOMIS, 1981; OKUMURA et al., 2011).

Em consequência disto, o N é o nutriente mais exigido pelas plantas e, por isso, um dos principais fatores limitantes para a produtividade de milho, caracterizada como uma das culturas mais exigentes em fertilizantes (FAQUIN, 2005; FORNASIERI FILHO, 2007).

Apesar de abundante na atmosfera, o nitrogênio é escasso no solo nas formas inorgânicas de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+), as quais são metabolizadas pelas plantas (FAQUIN, 2005; FORNASIERI FILHO, 2007). Aproximadamente 98% do N no solo encontra-se na forma orgânica e somente 2% nas formas absorvíveis pelas plantas (MALAVOLTA, 2006).

Contudo, o fornecimento de N via fertilizantes químicos é um dos, senão o principal, fatores responsáveis pelo alto custo de produção das culturas. Isto se deve ao fato de que a conversão industrial, por meio da quebra da molécula de N_2 para a obtenção dos adubos nitrogenados é um processo dispendioso, amentando o custo e limitando a produção.

Vale ressaltar que o consumo de adubo nitrogenado é crescente, sendo vendidos no primeiro semestre de 2013, 1.470 mil toneladas, volume 7,1% maior que o mesmo período do ano anterior. Isso ocorreu em virtude do aumento da demanda de adubação de cobertura na safrinha de milho e trigo, nas regiões Centro-Oeste e Sul, respectivamente (FERREIRA; VEGRO, 2013).

Neste contexto, há expectativa de incremento substancial no uso de fertilizantes no Brasil para atender à intensificação da agricultura e à recuperação de áreas degradadas. No entanto, o País depende em grandes proporções das importações, sendo necessário encontrar um maneiras para o uso eficiente de fertilizantes. Neste aspecto, cabe a utilização de bactérias promotoras do crescimento de plantas, afim de garantir altas produtividades com menor custo (HUNGRIA, 2011).

2.3. Bactérias do Gênero *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum* estudado pela primeira vez por Johanna Döbereiner concentra as espécies de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas mais pesquisadas até o momento, dentre elas *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonenses* e *A. irakense* (DALLA SANTA et al., 2004; REIS JUNIOR et al., 2008).

As rizobactérias *Azospirillum* spp. são Gram-negativas, em forma de bastonetes uniflagelados, de vida livre, extremamente móveis, que apresentam um versátil metabolismo de carbono e nitrogênio que as conferem aptidão para se desenvolver no ambiente competitivo da rizosfera (HALL; KRIEG, 1984; STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000).

Estas bactérias, também denominadas promotoras do crescimento de plantas, apresentam capacidade de fixação biológica de nitrogênio, formando diferentes tipos de associação com plantas não leguminosas, com potencial para aumentar a produção de cereais e gramíneas de importância econômica sob diversas condições climáticas (BASHAN; HOLGUIN; BASHAN, 2004; DALLA SANTA et al., 2004).

Além disso, se destacam pela produção de fitohormônios indutores de crescimento, como auxinas, que estimulam o crescimento de raízes, aumentando a

capacidade da planta em absorver água e nutrientes, além de giberelinas e citocinas (OKON; VANDERLEYDEN, 1997; DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003; DALLA SANTA et al., 2004).

Em relação à fixação biológica de nitrogênio (FBN), fundamenta-se o fato de que o N₂ gasoso abundante na atmosfera não está disponível às plantas, onde dois átomos de N se encontram em uma ligação tripla extremamente forte. Por outro lado, algumas bactérias presentes no solo são capazes de converter o N₂ atmosférico em amônio (NH₄⁺) por meio da ação da enzima nitrogenase (HUNGRIA; CAMPOS; MENDES, 2007). De tal modo, foi comprovada a eficiência de *Azospirillum* spp. em tornar o nutriente possível de ser assimilado e utilizado pelas plantas (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000).

Neste contexto, ao se propor maneiras sustentáveis e eficientes no uso do nitrogênio, destaca-se a FBN. A utilização de microrganismos benéficos ou associativos é bem conhecida em espécies de leguminosas pelo modelo de simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium*. Em gramíneas, diversas espécies de *Azospirillum* e outros gêneros já foram descritos por pesquisadores, sendo a maior parte encontrada em solos brasileiros (BALDANI et al., 1997).

O gênero *Rhizobium* fixa N₂ atmosférico somente em estado de simbiose e quando associado endofiticamente a raízes de leguminosas formando nódulos que agem como microambiente para a conversão do N₂, onde ocorre a FBN (KUMAR; RAO, 2012).

Em plantas leguminosas, como a soja, a formação dos nódulos nas raízes e/ou caules está relacionada com a eficiência do processo de FBN. No entanto, o mesmo não é observado em gramíneas associadas a bactérias do gênero *Azospirillum*, a ausência desta estrutura ou da colonização endofítica resulta em menor eficiência de FBN e faz com que o N seja transferido muito lentamente da bactéria para planta, onde apenas uma pequena parte torna-se disponível ao vegetal (VAN DOMMELEN et al., 1998). Isto ocorre, pois a maioria das bactérias do gênero *Azospirillum* coloniza as raízes superficialmente, sendo poucas as estirpes capazes de infectar (DOBEREINER; BALDANI, REIS, 1995)

Pesquisas com inoculantes na formulação líquida ou turfosa a base de *Azospirillum* vem sendo desenvolvidas desde 1996, pela Embrapa Soja em parceria

com a Universidade Federal do Paraná. Estes estudos permitiram a seleção de estirpes com características importantes como maior sobrevivência no solo, maior promoção de crescimento das plantas e maior adaptação às tecnologias utilizadas nas culturas do milho e do trigo. Assim, atualmente as empresas produtoras de inoculantes priorizam a utilização de *A. brasilense* das estirpes AbV5 e AbV6 (HUNGRIA, 2011).

De acordo com HUNGRIA (2011) os inoculantes contendo bactérias do gênero *Azospirillum* são comercializados nas duas formulações, líquida ou turfosa, contendo a concentração mínima exigida pela legislação de 10^8 células mL⁻¹ ou g⁻¹, respectivamente. A forma líquida é preferida pelos agricultores devido à facilidade de aplicação, tanto via semente como via solo no sulco de plantio. Mais recentemente, vem sendo avaliada a inoculação via solo paralelamente à linha quando as plantas se encontram em estágio de desenvolvimento mais avançado, antes ou juntamente com a adubação de cobertura.

Segundo recomendações das empresas fornecedoras do produto, a aplicação via sementes é realizada preferencialmente utilizando máquinas misturadoras, como tambor giratório, que permitem a inoculação mais rápida e homogênea de grande volume de sementes. No caso dos inoculantes turfosos é indicado a umidificação das sementes com solução adesiva antes da inoculação do produto, sendo necessária a secagem a sombra após o procedimento. Ou ainda, o inoculante turfoso pode ser previamente diluído em água para as concentrações de uso recomendada e então realizada a mistura.

No caso da inoculação no sulco de semeadura há necessidade do equipamento específico em que se utiliza maior volume do inoculante, por outro lado este método reduz os riscos dos efeitos tóxicos dos produtos utilizados no tratamento de sementes.

Para a cultura do milho e outras gramíneas a inoculação com *Azospirillum* spp. vem sendo praticada, mostrando incrementos de produtividade (BRACCINI et al., 2012). No entanto, o sucesso da inoculação pode estar diretamente relacionado com a especificidade da interação entre espécies ou genótipos de plantas e as espécies ou estirpes das bactérias, assim como fatores relacionados ao ambiente (HUNGRIA, 2011; BRACCINI et al., 2012).

A resposta diferencial de genótipos milho a diferentes estirpes de bactéria foi verificada avaliando o comportamento de 12 cultivares inoculados com estirpes específicas de *Azospirillum*. Nesse estudo, foi demonstrado que a eficiência da inoculação é dependente do genótipo do hospedeiro e da bactéria, sugerindo que selecionando-se os genótipos adequados, a fertilização com nitrogênio pode ser parcialmente substituída pela inoculação com *Azospirillum* spp. (GARCIA DE SALOMONE et al., 1996).

Do mesmo modo, ao avaliar a resposta de 19 cultivares de milho a diferentes estirpes de bactérias diazotróficas, foi possível observar que há diferença nas respostas de genótipos às bactérias que colonizam a rizosfera das plantas. Alguns destes genótipos se mostraram mais responsivos à interação com bactérias diazotróficas em relação à FBN, e o nível de adubação nitrogenada pode influenciar na fixação biológica (MONTAÑEZ et al., 2005).

Mais benefícios foram relatados ao avaliar o efeito da inoculação com *Azospirillum brasilense* AZ39 em dois genótipos de milho, cultivados em anos, locais e manejos diferentes. Neste estudo, foi verificado que a inoculação promoveu incremento de 7,2% para massa seca de parte aérea e 15,4% e 7,4% na produção de grãos no primeiro e segundo ano do experimento, respectivamente, em relação ao tratamento que não recebeu fertilização com nitrogênio e inoculação (LANA et al., 2012).

Pesquisadores relatam que a inoculação com *Azospirillum* spp. reduz o uso de fertilizantes nitrogenados em 20-50% e que os resultados foram superiores quando fertilizantes orgânicos foram incorporados (BASHAN; HOLGUIN; BASHAN, 2004).

Desta forma, a utilização de cultivares adaptadas a ambientes carentes de N e suscetíveis a associação com bactérias diazotróficas pode se tornar uma alternativa sustentável e economicamente viável para a produção econômica do milho em sistemas agrícolas com baixa utilização de insumos (ROESCH et al., 2005).

2.4. Expressed Sequence Tags (ESTs) Relacionadas ao Metabolismo do Nitrogênio

Muitos benefícios já foram observados após a inoculação de plantas de milho com bactérias *Azospirillum* spp., mas, o modo como a bactéria beneficia as plantas ainda não foi totalmente esclarecido.

Em relação à assimilação do N, o perfil de expressão de genes que codificam enzimas como nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS), pode contribuir para o melhor entendimento deste tipo de interação quanto a FBN, uma vez que estas são enzimas chaves no metabolismo do nitrogênio.

O metabolismo do nitrogênio pode ser dividido em dois estágios, sendo o nitrato a forma do nutriente preferencialmente absorvido pelas plantas. Primeiramente, o nitrato (NO_3^-) é convertido a nitrito pela NR, sendo o nitrito é convertido a amônio (NH_4^+). O nitrito então é assimilado pela ação das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT), respectivamente nos aminoácidos glutamina e glutamato, translocando o N orgânico na planta (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000; FERREIRA et al., 2002) (Figura 1).

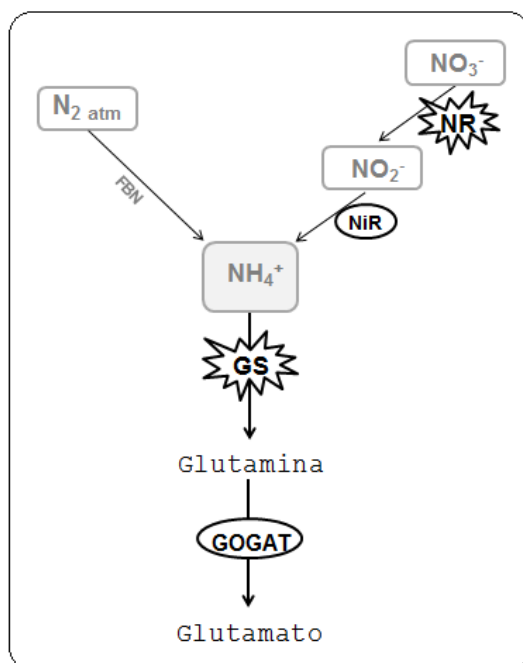


Figura 1. Enzimas chaves envolvidas no metabolismo de nitrogênio. Nitrato Redutase (NR); Nitrito Redutase (NiR); Glutamina Sintetase (GS); Glutamato Sintase (GOGAT); Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN).

A NR é a primeira a atuar, possibilitando a incorporação do NH_4^+ aos compostos orgânicos presentes na parte radicular e/ou área das plantas (PURCINO et al., 1994; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Devido a sua importância, a atividade desta enzima poderia estar relacionada com a produtividade das culturas, uma vez que plantas com maior capacidade de assimilar o nitrato disponível no solo apresentam maior eficiência no uso de nitrogênio, conseqüentemente contribuindo para o incremento da produção (VIANA et al., 2010).

No entanto, já foram realizados diversos trabalhos verificando a atividade da NR em diferentes fases do desenvolvimento da cultura milho, sua relação com a produção de grãos e a eficiência no uso do N, sendo os resultados obtidos ambíguos (PURCINO et al., 1994).

Quando fornecida as doses de N de 20 e 60 kg ha^{-1} a 15 genótipos de milho não foi verificado efeito na atividade da NR, mas houve diferença na atividade em relação aos estágios de desenvolvimento das plantas (3 dias antes, 20 e 42 dias após embonecamento) (PURCINO et al., 1994).

Em trigo foi observada que a atividade da NR oscilou em função das doses de N fornecidas na forma de ureia, ocorrendo acréscimo da atividade da enzima somente até o fornecimento de 158 mg dm^{-3} e com doses de N superiores houve decréscimo da atividade da NR (VIANA;KIEHL, 2010). Em milho, o mesmo perfil de expressão para a NR foi verificado sendo que o fornecimento de doses de N via uréia acima de 100 kg ha^{-1} proporcionou a redução na atividade enzimática da NR (SILVA et al., 2011).

Ao se estudar o efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias *Azospirillum* spp. e *Herbaspirillum* spp. sobre a cultivar Nitroflint de milho, verificou-se que a NR foi induzida pelas maiores doses de N e não apresentou relação com a inoculação das bactérias. Por outro lado, a atividade da GS foi aumentada em raízes, sendo correlacionada positivamente com o crescimento bacteriano (MACHADO et al., 1998).

Em duas variedades de cana-de-açúcar avaliadas sob diferentes condições hídricas e inoculadas com bactérias dos gêneros *Herbaspirillum* e *Glucanoacetobacter*, foi possível observar que a atividade da NR variou em função

das variedades testadas, das bactérias inoculadas e do regime de irrigação, indicando que há diferença entre a interação variedades x bactéria x condição hídrica, e que a inoculação com bactérias diazotróficas pode contribuir para eficiência do uso de nitrogênio em condições de déficit hídrico (MARCOS, 2012).

A GS, por sua vez, desempenha papel específico durante o desenvolvimento da planta na assimilação e remobilização de NH_4^+ . Pode se apresentar em duas isoformas nas plantas superiores, caracterizadas pela localização na célula vegetal, a primeira encontra-se no citosol (GS1) e a outra nos plastídeos (GS2). Ambas atuam sobre o NH_4^+ , catalisando a reação de síntese de glutamina para gerar glutamato (CREN; HIREL, 1999; BERNARD; HABASH, 2009).

Sendo assim, a atividade da GS pode ser aumentada na presença de bactérias fixadoras de N, uma vez que há maior disponibilização de NH_4^+ para as plantas em modelos de simbiose (MACHADO et al., 1998). Desta forma, foi verificado que a cultivar de milho Nitroflint quando inoculada com bactérias *Azospirillum* spp. e *Herbaspirillum* spp., teve a atividade da GS aumentada em raízes, correlacionada positivamente com o crescimento bacteriano (MACHADO et al., 1998).

Em folhas de milho foi observada correlação positiva entre teor de nitrato, atividade da GS, aumento de produtividade e seus componentes. Com os resultados foi possível inferir que, o aumento de produtividade está relacionado à capacidade dos genótipos avaliados acumularem nitrato em suas folhas durante a fase vegetativa, remobilizando o nutriente durante o enchimento de grãos (HIREL et al., 2001).

Interessantemente, no mesmo estudo, foram verificados QTL para produção relacionadas a genes que codificam GS1, sendo assim ferramenta relevante para seleção quanto a eficiência no uso de nitrogênio na cultura do milho (HIREL et al., 2001).

Ao se quantificar RNAs que codificam as seis genes de GS em nove tecidos de milho, foi observado um perfil de expressão distinto para cada um dos transcritos. Os transcritos de isoformas GS1, *gln1-3* e *gln1-5* apresentaram nível de expressão significativamente detectável em todos os tecidos, dentre eles cultura de células,

limbo foliar, parte aérea de plântulas, raízes, ponteira de raízes, endosperma em desenvolvimento, espigas novas, pólen e pendão (LI et al., 1993).

Buscando elucidar a translocação de N em folhas de milho durante o período de enchimento de grãos, três genótipos foram avaliados sob altos e baixos níveis de adubação nitrogenada e os resultados revelaram a relação linear entre a atividade de GS e teor de N em folhas, sugerindo que a GS pode auxiliar na avaliação do nível de N (HIREL et al., 2005).

Assim, é possível observar que estudos relacionados com enzimas chaves no metabolismo do nitrogênio apresentam resultados preliminares promissores em milho. No entanto, são necessários mais estudos dos perfis de expressão dos genes codificadores em genótipos de milho inoculados com *A. brasilense*.

Diante do exposto, o direcionamento de programas de melhoramento para a seleção de genótipos responsivos à interação com bactérias diazotróficas, como *Azospirillum* spp., torna-se uma alternativa promissora e que deve ser considerada (HUNGRIA, 2011).

REFERÊNCIAS

- BALDANI, J.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOE, S.R.; DÖBEREINER, J.. Recent Advances in bnf with Non-Legume Plants. **SoitB idt.B iochem**, v.29,p. 911-922, 1997.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN,G.; BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological,molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003) **Can. J. Microbiol.**, v.50, p. 521–577,2004.
- BERNARD, S.M.; HABASH, D.Z.. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. **New Phytologist**, 182, p. 608–620, 2009.
- BRACCINI, A.L.; DAN L.G.M.; PICCINI, G.G.; ALBRECHT L.P.; BARBOSA, M.C.; ORTIZ, A.H.T. Seed Inoculation with *Azospirillum brasilense*, Associated with the Use of Bioregulators in Maize. **Revista Caatinga**, v. 25, p. 58-64, 2012.
- BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367p.
- CARVALHO R.P.; VON PINHO R.G.; DAVIDE L.M.C. Desempenho de Cultivares de Milho Quanto à Eficiência de Utilização de Nitrogênio, **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**,10, p. 108-120, 2011.

CONAB. Acomp. safra bras. grãos, v. 1 - Safra 2013/14, n. 6 - Sexto Levantamento, Brasília, p. 1-83, mar. 2014.

CREN, M.; HIREL, B. Glutamine synthetase in higher plants: regulation of gene and protein expression from the organ to the cell. **Plant Cell Physiol.**, 40, p.1187–1193, 1999.

DALLA SANTA, O.R.; SOCCOL, C.R.; RONZELLI JUNIOR, P.; HERNÁNDEZ, R.F.; ALVAREZ, G.L.M.; DALLA SANTA, E.S.; PANDEY, A. Effects of inoculation of *Azospirillum* sp. in maize seeds under field conditions. **Food, Agriculture & Environment**, v. .2, p. 238-242, 2004.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.22, p.107-149, 2003.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: Fendrik, I.; Del Gallo, M., Vanderleyden, J.; Zamaroczy, M. Eds. *Azospirillum* VI and Related Microorganisms, Springer, Berlin. pp. 3-14., 1995.

FAQUIN. V. Nutrição Mineral de Plantas. il. **Curso de Pós-Graduação “Lato Sensu” (Especialização) a Distância: Solos e Meio Ambiente**. Lavras: UFLA / FAEPE, p.81-91, 2005.

FERREIRA, V.M.; MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M.; OLIVEIRA, L.E.M.; PURCINO, A.A.C. Metabolismo do nitrogênio associado à deficiência hídrica e sua recuperação em genótipos de milho, **Ciência Rural**, 32, 1, p.13-17, 2002.

FERREIRA, C.R.R.T.; VEGRO, C.L.R. Entregas em 2013 Permanecem Aquecidas Após Recorde nas Vendas em 2012. publicado em 23/08/2013. IN: IEA, Instituto de Economia Agrícola. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=12717>, Acesso em 01mar. 2014.

FORNASIERI FILHO, D. **Manual da Cultura do Milho**. Jaboticabal: Funep, 576 p., 2007.

GARCIA DE SALAMONE, I.E.; DOBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M.. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the aSN isotope dilution technique. **Biol Fertil Soils**, 23, p. 249-256, 1996.

GUIMARÃES, L.J.M. **Caracterização de genótipos de milho desenvolvidos sob estresse de nitrogênio e herança da eficiência do uso deste nutriente**. 2006, 110f. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

HALL, P.G.; KRIEG N.R. Application of the indirect immunoperoxidase stain technique to the flagella of *Azospirillum brasiliense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.47, n.2, p.433-435, 1984.

HIREL, B.; BERTIN, P.; QUILLERE', 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**, 125, p. 1258–1270, 2001.

HIREL, B., MARTIN, A.; TERCE'-LAFORGUE, T.; GONZALEZ-MORO, M.B.; ESTAVILLO, J.M. Physiology of maize I: a comprehensive and integrated view of nitrogen metabolism in a C4 plant. **Physiol Plant**, 124: 167–177, ISSN 0031-9317, 2005.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: **Embrapa Soja**, 283, 80p., 2007.

HUNGRIA, M.. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: **Embrapa Soja**, ISSN 1516-781X; 325, p.36, 2011.

KOUCHEBAGH, S.B.; MIRSHEKARI, B.; FARAHVASH, F. **Improvement of Corn Yield by Seed Biofertilization and Urea Application World Applied Sciences Journal**, v.16, p. 1239-1242, 2012.

KUMAR, S.R.S.; RAO, K.V.B. Biological nitrogen fixation. International Journal of Advanced Life Sciences, v.1, ISSN 2277 -758X, 2012.

LANA, M.C.; DATORA, J.; MARINI, D.; HANN, J.E. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Rev. Ceres**, v.59, p.399-405, 2012.

LI, M.G.; VILLEMUR, R.; HUSSEY, P.J.; SILFLOW, C.D.; GANTT, J.S.; SNUSTAD, D.P. Differential expression of six glutamine synthetase genes in *Zea mays*. **Plant Molecular Biology**, 23, p. 401-407, 1993.

MACHADO, A.T.; SODEK, L.; DOBEREINER, J.; REIS, V.M. Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho Nitroflint. **Pesq. Agropec Brasileira**, 33, p.961-970, 1998.

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 Brasil. Bot.**, V.25, p.129-136., 2002.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Editora Ceres, 2006. 631p.

MARCOS, F. C.C.. **Influência de bactérias endofíticas na fisiologia de plantas de cana-de-açúcar sobre restrição hídrica**. 2012. 64f. Dissertação (mestrado), Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2012.

MONTAÑEZ, A.; ABREU, C.; GILL P.R.; HARDARSON, G.; SICARDI, M.. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by 15N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biol Fertil Soils**, 45, p. 253–263 doi: 10.1007/s00374-008-0322-2, 2005.

NOVOA, R.; LOOMIS, R. S. Chapter 7: Nitrogen And Plant Production In: **Plant And Soil**, 58, p.177-204, 1981.

OKUMURA, R. S.; TAKAHASHI, H. W.; SANTOS, D. G. C.; LOBATO, A. K. S.; MARIANO, D. C.; MARQUES, O. J.; SILVA, M. H. L.; OLIVEIRA NETO, C. F.; LIMA JUNIOR J. A. Influence of different nitrogen levels on growth and production parameters in maize plants. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, 9, 3-4, p. 510-514, 2011.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants, *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, n.7, p.366-370, 1997.

PAVÃO, A.R.; FERREIRA FILHO, J.B.S. Impactos Econômicos da Introdução do Milho Bt11 no Brasil: uma abordagem de equilíbrio geral inter-regional. **RESR**, v.49, p. 81-108, 2011.

PURCINO, A.A.C.; MAGNAVACA, R.; MACHADO, T.; MARRIEL, I.E.. Atividade da redutase do nitrato em genótipos antigos e modernos de milho, cultivados sob dois níveis de nitrogênio. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, 6, p. 41-46, 1994.

REIS JUNIOR, F.B.; MACHADO, C.T.T.; MACHADO, A.T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **R. Bras. Ci. Solo**, v.32, p.1139-1146, 2008.

ROESCH, L.F.; CAMARGO, F.; SELBACH, P.; SÁ E.S. PASSAGLIA, L.. Identificação de cultivares de milho eficientes na absorção de nitrogênio e na associação com bactérias diazotróficas. **Ciência Rural**, 35,4, p. 924-927, 2005.

SILVA, S.M.; OLIVEIRA, L.J.; FARIA, F.P.; REIS, E.F.; CARNEIRO, M.A.C.; SILVA S.M.. Atividade da enzima nitrato redutase em milho cultivado sob diferentes níveis de adubação nitrogenada e potássica. **Ciência Rural Online**, ISSN 0103-8478, 2011.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiol Rev.**, v.24, p.487–506, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre:Artmed, 2004. 719p.

VAN DOMMELEN, A.; KEIJERS, V.; VANDERLEYDEN, J.; ZAMAROCZY, M. (Methyl)ammonium Transport in the Nitrogen-Fixing Bacterium *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, p. 2652–2659, 1998.

VIANA E.M.; KIEHL J.C.. Doses de nitrogênio e potássio no crescimento do trigo. **Bragantia**, 69, 4, p. 975-982, 2010.

YADAV, S.; YADAV, J.; SINGH, S.G. Performance of *azospirillum* for improving growth, yield and yield attributing characters of maize (*Zea mays* L.) in presence of nitrogen fertilizer. **Research Journal of Agricultural Sciences**, v. 2, p. 139-141, 2011.

CAPÍTULO 2 – QUALIDADE DE SEMENTES, TEORES DE CLOROFILA E NITROGÊNIO FOLIAR EM MILHO INOCULADO COM *Azospirillum brasilense*

Seed quality, chlorophyll and nitrogen content in leaves of maize inoculated with
Azospirillum brasilense

RESUMO - O objetivo foi avaliar diferenças entre genótipos de milho quanto à resposta germinativa das sementes e crescimento de plântulas inoculadas com *Azospirillum brasilense*, assim como o efeito da inoculação no teor de nitrogênio e índice de conteúdo de clorofila foliar. A qualidade fisiológica de sementes dos híbridos simples, AG7098 e 2B707, e das variedades sintéticas experimentais, V2 e V4, inoculados com *A. brasilense* foi avaliada por meio de testes de germinação, porcentagem e velocidade de emergência, massa de matéria seca de parte aérea e raiz. O teor de nitrogênio e o índice de conteúdo de clorofila foram avaliados em folhas dos mesmos quatro genótipos cultivados em casa de vegetação sob diferentes sistemas de fornecimento de nitrogênio e formas de inoculação com *A. brasilense*. Os genótipos diferem em relação à inoculação com *A. brasilense*. Os híbridos foram responsivos à inoculação com *A. brasilense* para massa de matéria seca de raiz. A variedade V2 apresentou comportamento inferior quanto à massa de matéria seca de raiz, mas respondeu positivamente a massa de matéria seca de parte aérea, e V4 não apresentou diferenças significativas quando inoculada. Os resultados de índice de conteúdo de clorofila não foram significativos. Para teor de nitrogênio foliar cada genótipo avaliado respondeu de maneira particular. É possível inferir que os híbridos avaliados responderam melhor à inoculação com a bactéria, sendo que o maior desenvolvimento de raízes leva ao maior aproveitamento de água e nutrientes.

Palavras-chave *Zea mays* L., bactérias diazotróficas, fixação biológica de nitrogênio, interação planta x bactéria

ABSTRACT - This study aimed to evaluate differences between maize genotypes as to seed germination response and seedling growth inoculated with *A. brasilense* and the effects of inoculation on nitrogen and chlorophyll content. The seed physiological

quality of simple hybrids AG7098 e 2B07 and two experimental synthetic varieties, V2 e V4, inoculated with *A. brasilense* was evaluated by germination, percentage and speed of emergence index, and dry mass of shoot and root tests. The nitrogen content and the chlorophyll content were measured in leaves from the same four genotypes grown in greenhouse under six systems of nitrogen supply and inoculation forms with *A. brasilense*. The genotypes responded differently to inoculation with *A. brasilense*. Hybrids showed to be responsive for root dry mass. As regards varieties, 2 had lower performance as the mass of root dry mass, however, responded positively to dry mass of shoots and 4 presented no differences when inoculated. The results of index of leaf chlorophyll content were not significant. The evaluated genotypes presented a particular way of response in relation to the nitrogen content of leaves. The hybrids responded better to inoculation with bacteria due to the higher development of roots leads to greater use of water and nutrients.

key words: *Zea mays* L., diazotrophs, biological nitrogen fixation, plant x bacteria interaction

INTRODUÇÃO

Na cultura do milho (*Zea mays* L.) os incrementos em produtividade por meio do melhoramento genético são evidentes, mas, a baixa produtividade média nacional está diretamente ligada a fatores como a fertilidade do solo e a baixa tecnologia adotada na utilização de insumos.

Neste contexto, destaca-se a adubação nitrogenada, que fornece o macronutriente mais exigido e absorvido pela planta de milho e mais limitante à produção, o nitrogênio (FAQUIN, 2005; OKUMURA et al., 2011). Este elemento participa da composição de moléculas vitais como aminoácidos, proteínas, enzimas e clorofila, por sua vez relacionadas à expansão foliar, aumento da taxa fotossintética, maior crescimento, desenvolvimento e produção da planta (FAQUIN, 2005; OKUMURA et al., 2011).

O fornecimento de nitrogênio na forma de adubo químico é um dos principais fatores que oneram o custo de produção das culturas. Apesar de abundante na atmosfera, o nitrogênio é o nutriente mais escasso em praticamente todos os tipos

de solos nas formas que é metabolizado pelas plantas, nitrato e amônio (NOVOA; LOOMIS, 1981; FORNASIERI FILHO, 2007).

Dentre as maneiras sustentáveis e eficientes no uso do nitrogênio está a fixação biológica do nitrogênio (FBN). A utilização de microorganismos benéficos às plantas é conhecida, em espécies de leguminosas, pelo modelo de simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium*.

Na década de 70 a identificação por Döbereiner e Day (1976) de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* associadas às raízes de gramíneas e sua capacidade de FBN, despertou a comunidade científica para os potenciais benefícios deste tipo de associação (HUNGRIA, 2011). Após este marco, outros gêneros e espécies de *Azospirillum* já foram descritos por pesquisadores e a maior parte encontradas em solos brasileiros (BALDANI et al., 1997; HUNGRIA, 2011).

Diversas contribuições já foram relatadas por pesquisadores como resultado da interação plantas x bactérias do gênero *Azospirillum*, dentre elas, incrementos nos teores de clorofila, de nitrogênio, de prolina em parte aérea e raízes, de condutância estomática; maior altura de plantas, produção de biomassa, produção de grãos, desenvolvimento de raízes e tolerância a estresse hídrico, entre outros (SWEDRZYNSKA; SAWICKA, 2000; HUNGRIA, 2011; YADAV; YADAV; SINGH, 2011; LANA et al., 2012).

No entanto, os resultados deste tipo de interação são altamente afetados por fatores ligados ao solo, ambiente e genótipo da planta e/ou da bactéria (DALLA SANTA et al., 2004; BRACCINI et al., 2012). A forma como é realizada a inoculação, via semente ou via solo, pode alterar a resposta das plantas à interação com a bactéria. Assim, o efeito sobre a qualidade fisiológica das sementes é relevante, uma vez que grande parte do sucesso da agricultura está fundamentada na alta qualidade das sementes utilizadas, visto que a semente é o veículo de toda tecnologia gerada pelo melhoramento genético.

É crescente a busca pelo melhor entendimento da interação *Azospirillum spp.* x planta, de modo a alcançar a eficiência do uso de bactérias diazotróficas em associação com a cultura do milho, com intuito de possibilitar incrementos na produtividade, além da redução dos custos de produção e práticas agrícolas mais sustentáveis e menos poluentes (HUNGRIA, 2011; LANA et al., 2012).

Diante disso, o trabalho foi realizado com o objetivo de verificar o efeito da inoculação com *Azospirillum brasilense* sobre a resposta germinativa das sementes, vigor de plântulas, e o teor de clorofila e nitrogênio em folhas de milho.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedimento Experimental

Os ensaios foram conduzidos sob condições controladas em laboratório e casa de vegetação do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, FCAV-UNESP, Jaboticabal-SP.

Foram avaliados quatro genótipos de milho, sendo dois híbridos simples comerciais (AG7098 e 2B707), e duas variedades sintéticas experimentais que estão em fase de registro junto ao MAPA denominadas V2 e V4. As sementes utilizadas foram fornecidas previamente tratadas com fungicida e inseticida pelas empresas produtoras de sementes.

A inoculação com *Azospirillum brasilense* foi realizada utilizando-se um produto comercial contendo as estirpes AbV5 e AbV6 de formulação líquida na concentração mínima de $5 \cdot 10^8$ células mL⁻¹ (Qualyfix Gramínea, Brasilquímica) nas doses sugeridas pelo fabricante; correspondendo a 4 mL Kg⁻¹ de sementes para inoculação via semente e 600 mL ha⁻¹ para inoculação do solo.

A inoculação das sementes foi realizada no momento da semeadura. As sementes foram colocadas em sacos plásticos, pesadas, adicionado o volume indicado do inoculante e realizada a homogeneização. Para a inoculação via solo o volume de inoculante foi distribuído paralelamente às plantas sobre o solo com auxílio de um pipetador automático aos 30 dias após emergência.

Experimento para Análise de Qualidade de Sementes e Vigor de Plântulas

Os experimentos de qualidade de sementes e de vigor de plântulas foram

conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições de 50 sementes.

A qualidade fisiológica das sementes dos quatro genótipos inoculados com *A. brasilense* foi avaliada por meio de testes de germinação e vigor. O teste de germinação foi preparado em papel mata borrão, umedecidos com água destilada, sobre o qual as sementes foram dispostas com auxílio de uma placa perfurada. Em seguida foram alocados em germinadores, conforme os critérios recomendados nas Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009). A contagem da porcentagem de plântulas normais germinadas foi realizada após 7 dias.

Para o teste de emergência de plântulas as sementes foram distribuídas em bandejas de plástico contendo a mistura areia: terra (2:1). Após a semeadura, as bandejas foram mantidas em sala de crescimento vegetal à 25°C e fotoperíodo de 12 horas. As contagens de plântulas emergidas foram realizadas diariamente até estabilização do estande, que ocorreu aos 14 dias após semeadura. Após este período foi considerada a porcentagem de plântulas normais aos 14 dias, quando houve estabilização, e o índice de velocidade de emergência (IVE), determinado segundo fórmula proposta por Maguire (1962).

Adicionalmente, foi realizada a avaliação de massa de matéria seca da parte aérea (MSA) e da raiz (MSR), determinadas utilizando-se quatro repetições de 25 plântulas coletadas ao final do teste de emergência as quais foram secas em estufa de ventilação forçada (65 °C) por 72 horas. Os cálculos foram obtidos dividindo-se a massa de matéria seca pelo número de plântulas (NAKAGAWA, 1999), e os resultados expressos em mg plântula⁻¹.

Experimento para Determinação do Teor de Clorofila e Nitrogênio em Folhas

Este ensaio foi montado em casa de vegetação, semeando-se os quatro genótipos em vasos com capacidade para 12 dm³ os quais foram preenchidos com solo do tipo latossolo vermelho eutrófico típico, textura argilosa (Anexo 1).

O ensaio foi conduzido em delineamento experimental de blocos casualizados em esquema fatorial 4 x 6 (genótipo x tratamento), com três repetições, sendo cada parcela experimental constituída de dois vasos com duas plantas cada. Os quatro

genótipos receberam os seguintes tratamentos: 1) Controle, sem inoculação e sem cobertura com N, 2) Inoculação via sementes com *A. brasilense* sem adubação de cobertura com N, 3) Inoculação via sementes e adubação de cobertura com 100 kg de N ha⁻¹, 4) Inoculação via solo sem adubação de cobertura com N, 5) Inoculação via solo e adubação de cobertura com 100 kg de N ha⁻¹, 6) Sem inoculação com adubação de cobertura com 100 kg de N ha⁻¹. Todos os vasos receberam adubação de base com a formulação N-P-K (8-28-16) de acordo com as recomendações para a cultura e, para os tratamentos que receberam N em cobertura aos 30 dias após emergência (d.a.e.) a fonte utilizada foi ureia (45% de N solúvel). Os vasos receberam irrigação diária e uniforme.

Foi amostrada a terceira folha totalmente expandida contada a partir do ápice (FERREIRA et al., 2002), das duas plantas contidas em cada parcela, aos 55 dias após emergência (FERREIRA et al., 2002; ROESCH et al., 2005, FORNASIERI FILHO, 2007), quando as plantas apresentavam 10 ou 11 folhas totalmente expandidas.

A leitura do teor de clorofila ocorreu no momento da coleta, entre 10 e 14 horas, quando a posição do sol é favorável ao uso do clorofilômetro. A leitura foi realizada na região mediana das folhas, lateralmente a nervura central, com o auxílio do clorofilômetro modelo CCM-200 (Opti-Scienses, Inc.), obtendo-se os dados de índice de conteúdo de clorofila foliar (ICC).

As folhas foram lavadas com água deionizada por três vezes, posteriormente acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa de ventilação forçada ± 65 °C. Em seguida retirou-se a nervura central das folhas, que foram moídas em moinho mecânico tipo Willey. O nitrogênio total foi extraído por digestão sulfúrica a quente conforme descrito por Bataglia et al. (1983).

Os dados de porcentagem de germinação e emergência, MSA, MSR, ICC e TN foram submetidos à análise de variância e teste F ($P \leq 0,05$), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Para verificar a distribuição normal dos dados foi utilizado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e somente os dados de porcentagem de germinação e emergência necessitaram de transformação, sendo a mesma realizada por raiz quadrada (\sqrt{x}). Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software Statistical Analysis System v.8 (SAS, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Germinação de Sementes e Vigor de Plântulas

A inoculação das sementes dos quatro genótipos de milho com *A. brasilense* não afetou a porcentagem de germinação (Tabela 1). No entanto, todos apresentaram altas porcentagens de germinação, superiores ao mínimo exigido para comercialização que é de 85%, estabelecido pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, IN nº45, de 17 de setembro de 2013. A porcentagem de germinação para os genótipos AG7098, 2B707, V2 e V4 foram de 95, 98, 91 e 94%, respectivamente.

Os genótipos responderam de forma diferenciada à inoculação quanto a massa de matéria seca de parte aérea (MSA) e de raiz (MSR) (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância com os quadrados médios e suas respectivas significâncias para germinação (G), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), massa de matéria seca de raiz (MSR), massa de matéria seca de parte aérea (MSA) em genótipos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense*

FV	GL	G	E	IVE	MSR	MSA
Genótipo	3	0,167 ^{ns}	0,011 ^{ns}	0,787 ^{ns}	1962,860**	519,138**
Inoculação	1	0,043 ^{ns}	0,160*	2,582*	985,347**	36,125 ^{ns}
Genótipo x Inoculação	3	0,119 ^{ns}	0,039 ^{ns}	0,517 ^{ns}	2789,499**	96,832*
Resíduo	24	0,081	0,024	0,455	65,559	24,652
CV(%)		2,93	1,59	5,76	8,26	9,55

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

A inoculação com *A. brasilense* não afetou a qualidade fisiológica das sementes demonstrando a viabilidade da utilização de inoculantes em milho via sementes.

Do mesmo modo, em sementes de três cultivares de trigo inoculadas com *A. brasilense*, estirpes AbV5 e AbV6, não foi verificado efeito da inoculação na germinação das sementes (RAMPIM et al., 2012). Também em trigo, utilizando outras estirpes, a inoculação de sementes com *A. brasilense* não apresentou efeito sobre a germinação (SILVESTRE et al., 2009).

A inoculação com *A. brasilense* afetou a porcentagem e a velocidade de emergência, porém, esta diferença é muito reduzida e em termos práticos não resulta em diferença entre os tratamentos. Provavelmente, foi detectada diferença, pois o CV (%) é muito baixo e, portanto, diferenças mínimas podem ser estatisticamente significativas (Tabela 1 e 2).

Tabela2. Porcentagem de emergência e índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de genótipos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense*

Inoculação <i>Azospirillum</i>	Emergência (%)	IVE
Sem	98 a	12,00 a
Com	95 b	11,43 b

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Segundo BARILLI et al. (2011), pode-se considerar que, não há efeito da inoculação com *A. brasilense* sobre a porcentagem final de germinação e IVE de sementes de milho. Outro estudo com sementes de arroz, foi observado que a inoculação com estirpes do gênero *Azospirillum* proporcionou maior velocidade de emergência e menor contaminação por fungos (ARAÚJO et al., 2010).

Os híbridos AG7098 e 2B707 apresentaram incremento significativo de MSR, de 113,65% e 17,74%, respectivamente, na presença de *A. brasilense*, não respondendo quanto à MSA (Tabela 3).

Para a V2 foi observado incremento de 28,35% em MSA quando inoculada com *A. brasilense*, mas, por outro lado, houve efeito negativo da inoculação para MSR. A V4 por sua vez, não respondeu à inoculação (Tabela 3).

O aumento de MSA pode implicar em maior produção de biomassa, consequentemente em maior produtividade. Segundo QUADROS (2009) e LANA et al. (2012) a inoculação com *A. brasilense* promoveu aumento de produtividade e massa seca de parte aérea em milho.

Tabela 3. Massa de matéria seca de raiz (MSR) e parte aérea (MSA), em mg por plântula, oriundas de sementes de genótipos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense*

Inoculação <i>Azospirillum</i>	Genótipo			
	AG7098	2B707	V2	V4
MSR				
Sem	50,85 Bb	99,40 Ab	106,41 Aa	113,03 Aa
Com	108,64 Aa	117,03 Aa	74,40 Bb	114,01 Aa
MSA				
Sem	63,60 Aa	52,70 Ba	38,10 Cb	49,40 Ba
Com	59,90 Aa	57,40 ABa	48,90 BCa	46,10 Ca

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Após a inoculação com as estirpes AbV5 e AbV6 de *A. brasilense* foram verificadas contribuições em relação ao crescimento radicular e altura de plantas de milho em ensaios de campo (HUNGRIA, 2011).

Também, plantas de milho que receberam metade da dose de nitrogênio e inoculação com *A. brasilense*, apresentaram valores de massa seca de planta semelhante aos tratamentos que receberam 100% da dose de nitrogênio, e superior as plantas que não receberam inoculação com *A. brasilense* (BRACCINI et al., 2012).

A inoculação com *A. amazonense* promoveu incremento na produção de massa seca de raiz de plantas de milho, contudo não foi observado efeito da bactéria sobre a massa seca de parte aérea (REIS JUNIOR et al., 2008).

Assim, fica evidente a influencia da inoculação com *A. brasilense* no desenvolvimento das raízes nos híbridos, o que está diretamente ligado ao potencial de exploração do solo pelas plantas. Apesar de não suprirem toda a necessidade de N das plantas, bactérias diazotróficas podem influenciar sobremaneira a nutrição nitrogenada das culturas o que está relacionado indiretamente ao aumento do sistema radicular (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000; MANTELIN; TOURAINE, 2004).

É possível inferir que os híbridos avaliados podem responder de maneira mais promissora à inoculação com a bactéria, uma vez que o maior desenvolvimento de

raízes pode aumentar a capacidade das plantas em absorver água e nutrientes, e, conseqüentemente, tornarem-se plantas mais vigorosas, por conseguinte mais tolerantes a situações adversas de seca, salinidade, patogenicidade (MANTELIN; TOURAINE, 2004; HUNGRIA, 2011) e produtivas.

Teor de Clorofila e Nitrogênio em Folhas de Genótipos

A inoculação com *A. brasilense* e a adubação nitrogenada não influenciaram o índice de conteúdo de clorofila (ICC) dos genótipos avaliados. Mas, houve diferença no ICC entre os genótipos (Tabela 4).

Para o teor de nitrogênio (TN) foliar foi observada interação significativa para formas de fornecimento de nitrogênio x genótipo, sugerindo que as respostas dos genótipos avaliados foram distintas em relação aos tratamentos recebidos (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo da análise de variância com os quadrados médios para índice de conteúdo de clorofila (ICC) e teor de nitrogênio (TN) na folha submetidos a diferentes formas de inoculação com *Azospirillum brasilense* e fornecimento de fertilizante nitrogenado

Fontes de Variação	GL	ICC	TN
Bloco	2	33,5617**	38,840**
Tratamento	5	12,283 ^{ns}	24,841**
Genótipo	3	90,954**	1,839 ^{ns}
Tratamento x Genótipo	15	15,558 ^{ns}	36,826**
Resíduo	118	18,680	3,572
CV(%)		13,31	5,33

** significativo pelo teste F a 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Geralmente, o aumento no teor de clorofila é considerado um parâmetro que coincide com o aumento na fotossíntese e, conseqüentemente, com o aumento do potencial produtivo e vigor das plantas (SWEDRZYNSKA; SAWICKA. 2000; BASHAN et al., 2006). Em milho foi verificado que a inoculação com *A. brasilense*

proporcionou incrementos do teor de clorofila e plantas mais vigorosas (HUNGRIA, 2011).

A inoculação com *A. brasilense* em trigo, promoveu aumento de pigmentos fotoprotetores e pigmentos fotoprotetivos auxiliares que beneficiam o crescimento das plantas. Neste estudo, os autores sugerem que a interação *Azospirillum* x planta envolvem múltiplos mecanismos de ação que são ativados simultaneamente, como efeito hormonal, fixação de nitrogênio e absorção de minerais (BASHAN et al., 2006).

O híbrido AG7098 apresentou ICC superior aos demais genótipos, esta pode ser considerada uma característica própria do genótipo (Tabela 5).

Tabela 5. Índice de Conteúdo de Clorofila (ICC) em folhas de genótipos de milho submetidos a diferentes formas de inoculação com *Azospirillum brasilense* e fornecimento de fertilizante nitrogenado

Genótipo	ICC
AG7098	34,82 a
2B707	31,38 b
V2	32,03 b
V4	31,64 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Avaliando o teor de clorofila em folhas em milho inoculado com *A. brasilense* sob diferentes doses de nitrogênio, verificou-se que o aumento no teor de clorofila foi proporcional às doses de nitrogênio, ocorrendo efeito positivo da inoculação (JORDÃO et al., 2010).

Embora para alguns genótipos de milho não tenha sido observada correlação entre ICC e TN foliar (ROCHA et al., 2005; SILVA et al., 2011), o teor de clorofila foliar pode ser uma alternativa viável para indicar o nível de N na planta (ARGENTA; SILVA; BORTOLINI, 2001; ARGENTA et al., 2003; SILVA et al., 2008).

Quanto ao TN foliar, ao analisarmos cada genótipo individualmente, observa-se que para o AG7098 a inoculação via sementes com *A. brasilense* com adubação de cobertura nitrogenada (tratamento 3) e a adubação nitrogenada convencional (tratamento 6) proporcionaram valores similares e superiores a inoculação via sementes sem adubação de cobertura com N (tratamento 2) que resultou no menor valor de TN (Tabela 6).

Tabela 6. Teor de nitrogênio foliar (g kg^{-1}) de genótipos de milho submetidos a diferentes formas de inoculação com *Azospirillum brasilense* e fornecimento de fertilizante nitrogenado

Tratamento	Genótipo			
	AG7098	2B707	V2	V4
	TN			
1	35,76 Aab	31,01 Cc	34,63 ABab	32,63 BCc
2	33,76 Bb	38,26 Aa	36,01 ABab	33,88 Bc
3	37,75 Aa	34,13 Bbc	35,51 ABab	34,76 Bbc
4	34,88 Bab	33,76 Bbc	34,76 Bab	41,13 Aa
5	35,13 BCab	38,26 Aa	37,76 ABa	34,01 Cc
6	36,51 Aa	35,76 ABab	33,51 Bb	37,88 Ab

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. 1) Controle, sem inoculação e sem cobertura com N, 2) Inoculação via sementes com *A. brasilense* sem adubação de cobertura com N, 3) Inoculação via sementes e adubação de cobertura com $100 \text{ kg de N ha}^{-1}$, 4) Inoculação via solo sem adubação de cobertura com N, 5) Inoculação via solo e adubação de cobertura com $100 \text{ kg de N ha}^{-1}$, 6) Sem inoculação com adubação de cobertura com $100 \text{ kg de N ha}^{-1}$.

O híbrido 2B707 mostrou-se responsivo tanto à inoculação com *A. brasilense* via sementes e sem adubação de cobertura com N (tratamento 2) como a inoculação via solo mais cobertura nitrogenada (tratamento 5). O controle (tratamento 1), por sua vez, apresentou-se inferior em relação aos demais tratamentos (Tabela 6). De acordo com os resultados, este híbrido dispensaria a adubação nitrogenada de cobertura quando inoculado com *A. brasilense* via sementes para obter o mesmo TN foliar.

A V2 apresentou maior TN quando inoculada com *A. brasilense* via solo em relação ao tratamento que recebeu somente N via fertilizante em cobertura (tratamento 6) (Tabela 6). Assim, a inoculação com *A. brasilense* via solo contribuiu para a melhor resposta da variedade V2 mesmo se fornecida toda a dose de nitrogênio recomendada para a cultura do milho.

A variedade V4 apresentou folhas com maior TN quando da inoculação com *A. brasilense* via solo (tratamento 4), seguido da cobertura com N (tratamento 6) (Tabela 6). Diante disso, a variedade V4 pode dispensar a adubação de cobertura se realizada a inoculação via solo, resultando no mesmo TN foliar.

Resultados semelhantes foram relatados em relação ao comportamento distinto de genótipos de trigo inoculados com *A. brasilense*, observando-se aumento no teor de nitrogênio da parte aérea de 35,3 e 22,4% em duas (CD 108 e CD 150, respectivamente) de cinco cultivares de trigo avaliadas (LEMOS et al., 2013).

Também foi observado o aumento no teor de nitrogênio em plantas de trigo cujas sementes foram inoculadas com *A. brasilense* sem fornecimento de nitrogênio (RODRIGUES et al., 2000).

A inoculação com *A. brasilense* proporcionou maior absorção de nitrogênio na fase pós-antese em trigo, que apesar de não incrementar a produção, promoveram acúmulo de nitrogênio e massa de matéria seca de palha. Neste estudo, a adubação nitrogenada de cobertura (45 kg ha^{-1} de N) pôde ser substituída quando da inoculação via sementes mais 15 kg ha^{-1} de N no plantio (DIDONET; RODRIGUES; KENNER, 1996).

O teor de nitrogênio em raízes de plantas de milho sob diferentes regimes e fontes de nitrogênio foi aumentado quando estas foram inoculadas com *A. amazonense* (REIS JUNIOR et al., 2008).

Por outro lado, não houve contribuição da inoculação de uma mistura de bactérias diazotróficas (*A. lipoferum*, *A. amazonense* e *Burkholderia kururiensis*) em nove genótipos de milho avaliados em relação ao conteúdo de nitrogênio acumulado (MENDONÇA; URQUIAGA; REIS, 2006).

Dentre 12 genótipos de milho inoculados com uma mistura de estirpes de *Azospirillum spp.*, foi observado que dois deles (Morgan 318 e Dekalb 4D-70), apresentaram aumento na produção de grãos equivalente à aplicação de $100 \text{ kg de N ha}^{-1}$. Neste estudo, o cultivo de plantas em solo contendo N^{15} marcado, permitiu verificar que as respostas de acúmulo de nitrogênio foram devido à fixação biológica de nitrogênio. Assim, se selecionados os genótipos adequados, a adubação nitrogenada pode ser parcialmente substituída pela inoculação com *Azospirillum spp.* (GARCIA DE SALOMONE et al., 1996).

O sucesso obtido pela inoculação com *Azospirillum spp.* em milho, trigo e milheto é influenciado por fatores como estirpe utilizada, estágio fisiológico da planta no momento da inoculação, afinidade entre estirpes da bactéria e genótipos da planta (BALDANI; BALDANI, 2005; REIS, 2007; BRACCINI et al., 2012).

Mais estudos com *A. brasilense* e genótipos de milho são necessários para se alcançar viabilidade no uso dessas bactérias e usufruir dos benefícios que esse tipo de microrganismo pode trazer para a cultura, uma vez que, estes se mostram

promissores no sentido de promover efeitos sobre caracteres relacionados ao incremento de produtividade, quando exploradas as interações adequadas.

CONCLUSÕES

- 1- A qualidade fisiológica das sementes não foi alterada com a inoculação com *A. brasilense*
- 2- Os genótipos respondem de forma diferenciada à inoculação com *A. brasilense*, sendo que os híbridos respondem melhor à bactéria quanto à massa de matéria seca de raiz.
- 3- A inoculação de genótipos de milho com *A. brasilense* e a adubação nitrogenada não influenciam o índice de conteúdo de clorofila, mas alteram o teor de nitrogênio foliar de forma positiva e diferenciada entre os genótipos.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A.E.S.; ROSSETTO, C.A.V.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Germinação e vigor de sementes de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 34, p. 932-939, 2010.

ARGENTA, G.; SILVA, P.R.F. & BORTOLINI, C.G. Teor de clorofila na folha como indicador do nível de N em cereais. **Ci. Rural**, v.31, p.715-722, 2001.

ARGENTA, G.; SILVA, P. R. F.; FOSTHOFER, E. L.; STRIEDER, M. L.; SUHRE, E.; TEICHMANN, L. L. Adubação nitrogenada em milho pelo monitoramento do nível de nitrogênio na planta por meio do clorofilômetro. **R. Bras. Ci. Solo**, v.27, p.109-119, 2003.

BALDANI, J.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D., GOE, S.R.; DÖBEREINER, J.. Recent Advances in bnf with Non-Legume Plants. **SoitB idt.B iochem**, v.29,p. 911-922, 1997.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, p549-579, 2005.

BARILLI, D.R.; TSUTSUMI, C.Y.; MAY, A.; MIRANDA, A.M.; HACHMANN, T.L.; MODOLON, T.A. Eficiência na inoculação do milho com *Azospirillum brasilense* em diferentes períodos antes da semeadura. **Cadernos de Agroecologia**, ISSN 2236-7934, v.6, p.1-5, 2011.

BASHAN, Y.; BUSTILLOS, J.J.; LEYVA, L.A.; HERNANDEZ, J.P.; BACILIO, M. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings

induced by *Azospirillum brasilense*. **Biology and Fertility of Soils**, v.42, p.279-285, 2006.

BATAGLIA, O. C.; FURLANI, A. M. C; TEIXEIRA, J. P. F.; FURLANI, P. R.; GALLO, J. R. **Métodos de análise química de plantas**. Campinas, Instituto Agronômico, Boletim técnico, 78, 48p., 1983.

BRACCINI, A.L.; DAN L.G.M.; PICCINI, G.G.; ALBRECHT L.P.; BARBOSA, M.C.; ORTIZ, A.H.T. Seed Inoculation with *Azospirillum brasilense*, Associated with the Use of Bioregulators in Maize. **Revista Caatinga**, v. 25, p. 58-64, 2012.

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399p.

DALLA SANTA, O.R.; SOCCOL, C.R.; RONZELLI JUNIOR, P.; HERNÁNDEZ, R.F.; ALVAREZ, G.L.M.; DALLA SANTA, E.S.; PANDEY, A. Effects of inoculation of *Azospirillum* sp. in maize seeds under field conditions. **Food, Agriculture & Environment**, v. .2, p. 238-242, 2004.

DIDONET, A.D.; RODRIGUES, O.; KENNER, M.H.. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*. *Pesq. agropec. bras.*, v.31, p. 645-651, 1996.

DOBEREINER, J.; DAY, J.M. *In* “ Nitrogen Fixation by free-living micro-organisms. Ed.:Stewart, W.D.P., Cambridge, p.30, 1976.

FAQUIN, V. Nutrição Mineral de Plantas. il. **Curso de Pós-Graduação “Lato Sensu” (Especialização) a Distância: Solos e Meio Ambiente**. Lavras: UFLA / FAEPE, p.81-91, 2005.

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

FORNASIERI FILHO, D. **Manual da Cultura do Milho**. Jaboticabal: Funep, 2007. 576 p.

GARCIA DE SALAMONE I.E.; DOBEREINER, J.; URQUIAGA, S. ; BODDEY, R.M. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the ASN isotope dilution technique. **Biol Fertil Soils**, v.23, p.249-256, 1996.

HUNGRIA, M.. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: **Embrapa Soja**, 2011, 325p.

JORDÃO, L.T.; LIMA, F.F.; LIMA, R.S.; MORETTI, P.A.E.; PEREIRA, H.V.; MUNIZ, A.S.; OLIVEIRA, M.C.N. Teor relativo de clorofila em folhas de milho inoculado com *Azospirillum braziliense* sob diferentes doses de nitrogênio e manejo com braquiária. 2010. **Anais: XXIX Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, XIII Reunião Brasileira sobre Micorrizas, XI Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo, VIII Reunião Brasileira de Biologia do Solo Guarapari**, p.5, 2010.

LANA, M.C., DATORA, J., MARINI, D., HANN, J.E. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Rev. Ceres**, v.59, p.399-405, 2012.

LEMOS, J.M.; GUIMARÃES, V.F.; VENDRUSCOLO, E.C.G.; SANTOS, M.F.; OFFEMANN, L.C. Resposta de cultivares de trigo à inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense*, e à adubação nitrogenada em cobertura **Científica**, v. 41, p.189–198, 2013.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling and vigour. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962.

MANTELIN, S.; TOURAINÉ, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 27-34, 2004.

MENDONÇA, M.M; URQUIAGA, S.S.; REIS, V.M. Variabilidade genotípica de milho para acumulação de nitrogênio e contribuição da fixação biológica de nitrogênio. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 41, p. 1681-1685, 2006.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYŻANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. ABRATES. cap.2, p.2-24, 1999.

NOVOA, R.; LOOMIS R.S. Nitrogen and plant production. *Plant and Soil*, v. 58, p.177-204, 1981.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants, *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, n.7, p.366-370, 1997.

OKUMURA, R. S., TAKAHASHI, H. W., SANTOS, D. G. C., LOBATO, A. K. S., MARIANO, D. C., MARQUES, O. J., SILVA, M. H. L., OLIVEIRA NETO, C. F., LIMA JUNIOR J. A. Influence of different nitrogen levels on growth and production parameters in maize plants. **Journal of Food, Agriculture & Environment**,9, 3-4, p. 510-514, 2011.

QUADROS, P.D. (2009) Inoculação de *Azospirillum* spp. em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 62p.

RAMPIM, L.; COSTA, A.C.P.R.; NACKE H.; KLEIN, J.; GUIMARÃES, V.F. Qualidade fisiológica de sementes de três cultivares de trigo submetidas à inoculação e diferentes tratamentos. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, p. 678–685, 2012.

REIS, V.M. Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para a aplicação em gramíneas. **Embrapa Agrobiologia**, Seropédica, Documentos: Embrapa Agrobiologia ISSN 1517-8498,232, 2007, p.22, 2007.

REIS JUNIOR, F.B.; MACHADO, C.T.T.; MACHADO, A.T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **R. Bras. Ci. Solo**, v.32, p.1139-1146, 2008.

ROCHA R. N. C.O, GALVÃO, J.C.C.;, TEIXEIRA, P.C.; MIRANDA, G.V.; AGNES E.L.; PEREIRA,P.R.G.; LEITE, U.T. Relação do índice SPAD, determinado pelo clorofilômetro, com teor de nitrogênio na folha e rendimento de grãos em três genótipos de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.4, p.161-171, 2005.

RODRIGUES, O.; DIDONET, A.D.; GOUVEIA, J.A.; SOARES, R.C. Nitrogen translocation in wheat inoculated with *Azospirillum* and fertilized with nitrogen. **Pesq. agron. bras.**, v. 35, p. 1473-1481, 2000.

ROESCH L.F., CAMARGO F., SELBACH P., SÁ E.S. PASSAGLIA L.. Identificação de cultivares de milho eficientes na absorção de nitrogênio e na associação com bactérias diazotróficas. **Ciência Rural**, 35,4, p. 924-927, 2005.

SILVA, L.S.; POCOJESKI, E.; GRAUPE, F.A.; PIT, L.L.; BUNDT, A.C.; GUTERRES, A.P. Leitura crítica do clorofilômetro para manejo da adubação nitrogenada na cultura do arroz irrigado por alagamento. **R. Bras. Agrocência, Pelotas**, v.14, p.125-127, 2008.

SILVA, S.M.; OLIVEIRA, L.J.; FARIA, F.P.; REIS, E.F.; CARNEIRO, M.A.C.; SILVA, S.M. Atividade da enzima nitrato redutase em milho cultivado sob diferentes níveis de adubação nitrogenada e potássica. **Ciência Rural**, v.41, p.1931-1937, 2011.

SILVESTRE, G.C.; PACENTCHUK,F.;PACENTCHUK,F.; SANDINI, I.E. Efeito da Inoculação de Bactérias Diazotróficas na Qualidade Fisiológica de Sementes de Trigo, **Anais da SIEPE Guarapuava –PR**, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Departamento de Agronomia. 2009.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiol Rev.**, v.24, p.487–506, 2000.

SWĘDRZYŃSKA, D.; SAWICKA, A. Effect of Inoculation with *Azospirillum brasilense* on Development and Yielding of Maize (*Zea mays* ssp. *Saccharata* L.) under Different Cultivation Conditions. **Polish Journal of Environmental Studies** v. 9, p. 505-509, 2000.

YADAV, S.; YADAV, J.; SINGH, S.G. Performance of *azospirillum* for improving growth, yield and yield attributing characters of maize (*Zea mays* L.) in presence of nitrogen fertilizer. **Research Journal of Agricultural Sciences**, v. 2, p. 139-141, 2011.

CAPÍTULO 3 – EXPRESSÃO QUANTITATIVA DE ESTS RELACIONADAS AO METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS DE MILHO INOCULADOS COM *Azospirillum brasilense*

Expression of nitrogen metabolism-related ESTs in maize genotypes inoculated with *Azospirillum brasilense*

RESUMO – O trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a expressão quantitativa relativa de *ESTs* chaves no metabolismo do nitrogênio em genótipos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense*. Para isso, foram avaliadas duas *ESTs* que codificam enzimas chaves da rota metabólica do N, a nitrato redutase (*ZmNR*) e a glutamina sintetase (*ZmGln1-3*) por meio da técnica de PCR quantitativa em tempo real. O experimento foi conduzido sob condições controladas, em casa de vegetação onde foram cultivados dois híbridos simples comerciais (AG7098 e 2B707) e duas variedades sintéticas experimentais (V2 e V4) sob diferentes formas de inoculação com *Azospirillum brasilense* e fornecimento de N. Os genótipos diferem em relação a inoculação com *A. brasilense*. A inoculação proporcionou incrementos na expressão de *ZmNR* para os híbridos AG7098 e 2B707. A variedade V2 não respondeu a inoculação e, V4 apresentou maior nível de expressão quando recebeu somente adubação de cobertura nitrogenada. De maneira geral, as variedades responderam negativamente ou não responderam a inoculação com *A. brasilense*, ao se comparar os genótipos dentro de tratamentos, sendo que V2 apresentou os menores valores de expressão de *ZmRN* para todas as formas de inoculação e fornecimento de N via fertilizante. Para o híbridos AG7098 e 2B707 e para variedade V4, a inoculação com *A. brasilense* induziu a expressão de transcritos *ZmGln1-3*. A variedade V2 não respondeu à inoculação quanto a expressão da *EST ZmGln1-3*.

Palavras-chave: *Zea mays* L., Nitrato Redutase, Glutamina Sintetase, qPCR

ABSTRACT- We aimed to verify the relative quantitative expression of keys ESTs on nitrogen metabolism in maize genotypes inoculated with *Azospirillum brasilense*. Thus, two ESTs which encode key enzymes of the metabolic pathway of N, nitrate reductase (*ZmNR*) and glutamine synthetase (*ZmGln1 -3*) were evaluated using the technique of quantitative PCR in real time. The experiment was conducted under

controlled conditions in a greenhouse house where two single cross hybrids (AG7098 and 2B707) and two experimental synthetic varieties (V2 and V4) were grown under different forms of inoculation with *A. brasilense* and supplying nitrogen. It was concluded that the genotypes differ in inoculation with *A. brasilense*. Inoculation provided increments in the expression of *ZmNR* for AG7098 and 2B707 hybrids. The variety V2 did not respond to inoculation and V4 showed higher expression level when received only nitrogen application. In general, the varieties responded negatively or did not respond to inoculation with *A. brasilense*, when comparing the genotypes within treatments; V2 showed lower expression values *ZmRN* for all forms of inoculation and fertilizer N supply. For AG7098 and 2B707 hybrids and variety V4, inoculation with *A. brasilense* induced the expression of transcripts *ZmGln1-3*. The V2 variety does not respond to inoculation as the expression of *ZmGln1-3*.

Key words: *Zea mays* L., Nitrate Reductase, Glutamine Synthetase, qPCR

INTRODUÇÃO

Por abranger diversas regiões do mundo, com os mais variados tipos de clima e solo, a cultura do milho (*Zea mays* L.) é conseqüentemente afetada por diversos fatores abióticos, como baixa fertilidade do solo, principalmente quanto ao nitrogênio (LANA et al., 2012). Este cenário revela uma agricultura convencional altamente dependente de fertilizantes químicos a fim de manter altos rendimentos (WALKER et al., 2012; AMARAL et al., 2014).

Os fertilizantes nitrogenados fornecem o nitrogênio (N), elemento considerado fundamental para a vida devido a sua participação em moléculas essenciais como proteínas e ácidos nucleicos, que por sua vez desempenham funções vitais (NOVOA; LOOMIS, 1981; XU; FAN; MILLER, 2012).

O N é um macronutriente chave para o desenvolvimento e reprodução vegetal (BERNARD; HABASH, 2009). Desta maneira, podemos relacionar a alta produção de grãos com a disponibilidade de N para as culturas.

O Milho é uma das culturas mais exigentes em N e, seu fornecimento, se tornou uma ferramenta relevante para o aumento da produtividade nas últimas décadas (HIREL et al., 2001).

No entanto, o alto valor dos fertilizantes nitrogenados contribui de forma enfática para o aumento do custo de produção. Assim, a melhoria das técnicas de cultivo deve ser alcançada com intuito de, não somente aumentar a produtividade do milho mas, também, melhorar a situação econômica do produtor (YADAV; YADAV; SINGHER, 2011).

Desperdícios e escassez de nitrogênio podem acarretar prejuízos econômicos e ambientais (CARVALHO; VON PINHO; DAVID, 2011), pois a baixa eficiência no uso de fertilizantes nitrogenados faz com que grande parte do N aplicado não seja aproveitado pelas plantas, podendo contaminar o lençol freático ou outras fontes de águas. Além do processo de produção desses fertilizantes contribuir para o efeito estufa.

Diante disso, torna-se promissora a viabilização de sistemas de produção eficientes, onde seja possível a redução da adubação nitrogenada. A utilização de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, capazes de fixar N e aumentar a produtividade em milho, vem sendo amplamente estudada.

Com tais características encontram-se as bactérias do gênero *Azospirillum* spp., capazes de se associar às raízes de plantas não leguminosas e promover benefícios às culturas. Este fato foi reportado há décadas por Johanna Döbereiner e, desde então diversos trabalhos vem comprovando os benefícios desta interação (BALDANI et al., 1997; DALLA SANTA et al., 2004; BALDANI; BALDANI, 2005 HUNGRIA et al., 2010).

Foi verificada a influência positiva no crescimento, desenvolvimento, produção de grãos e biomassa, além do conteúdo de N em plantas inoculadas com *Azospirillum* spp.. Tais benefícios têm sido atribuídos a diversos mecanismos de ação, como fixação biológica de nitrogênio (FBN) e produção de hormônios promotores de crescimento. Contudo, as contribuições resultantes da FBN ainda são discutidas (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000; BASHAN; HOLGUIN; BASHAN, 2004; BALDANI; BALDANI, 2005).

As fontes de N absorvidas pelas plantas são nitrato (NO_3^-) ou amônio (NH_4^+). Para que o N seja assimilado e convertido em aminoácidos, é necessário que haja a redução do nitrato em amônio. Primeiramente, ocorre a redução de nitrato em nitrito (NO_2^-), catalisada no citosol pela enzima nitrato redutase (NR), etapa considerada

limitante para a taxa de assimilação de N (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000; MORRISON; SIMMONS; STAPLETON, 2010).

Em seguida, o amônio gerado a partir do nitrito ou da fotorrespiração, reciclagem de aminoácidos, ou FBN, é metabolizado pelo complexo GS/GOGAT (Glutamina Sintetase/Glutamato Sintase) (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000; MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010).

Sendo assim, o conhecimento sobre os fatores que afetam a atividade da NR e o modo como a enzima é regulada torna-se pertinente, diante da importância que a assimilação do nitrato apresenta para o crescimento das plantas (SOLOMONSON; BARBER, 1990). Em milho, por exemplo, a assimilação de nitrato como forma de metabolizar o N é relevante em sistemas agrícolas que utilizam baixa ou alta tecnologia (MORRISON; SIMMONS; STAPLETON, 2010).

Com relação à GS são caracterizadas duas isoformas em plantas superiores, GS1, localizada no citosol e GS2, nos plastídeos. Ambas desempenham função chave na assimilação de amônio, principalmente as enzimas citosólicas (GS1), por assimilarem amônio a partir de diferentes fontes, inclusive produto da FBN (LI et al., 1993; BERNARD; HABASH, 2009).

Em milho, foi verificada correlação entre conteúdo de N, de clorofila, teor de proteína solúvel e atividade de GS, sendo encontrados QTL para peso de mil grãos correspondentes a localização de dois locus de GS1, (*gln1-3* e *gln1-4*) (HIREL et al., 2001; HIREL et al., 2005 a,b; MARTIN et al., 2006)

Ao se quantificar RNAs dos cinco genes de GS1 e de GS2 em nove tecidos de milho, foi observado um perfil de expressão distinto para cada um dos transcritos. Os transcritos de dois genes que codificam GS1, *gln1-3* e *gln1-5*, apresentaram nível de expressão significativamente detectável em todos os tecidos, dentre eles cultura de células, limbo foliar, parte aérea de plântulas, raízes, ponteira de raízes, endosperma em desenvolvimento, espigas novas, pólen e pendão (LI et al., 1993).

Nota-se que estudos relacionados às enzimas descritas acima e seus transcritos vêm apresentando resultados promissores. No entanto, o perfil de expressão destes genes em milho inoculado com *Azospirillum brasilense* necessita de mais estudos.

Diante do exposto, o trabalho foi realizado com o objetivo de verificar o efeito da inoculação com *Azospirillum brasilense* sobre o perfil de expressão temporal quantitativa de *ESTs* relacionadas ao metabolismo do nitrogênio em milho.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedimento Experimental

Os ensaios foram conduzidos sob condições controladas, em casa de vegetação do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, FCAV – UNESP, Jaboticabal-SP.

Foram avaliados quatro genótipos de milho, sendo dois híbridos simples comerciais (AG7098 e 2B707) e duas variedades sintéticas experimentais que estão em fase de registro junto ao MAPA, denominadas V2 e V4. As sementes utilizadas foram fornecidas, previamente tratadas com fungicida e inseticida, pelas empresas produtoras de sementes.

A inoculação com *Azospirillum brasilense* foi realizada utilizando-se um produto comercial contendo as estirpes AbV5 e AbV6 de formulação líquida na concentração mínima de $5 \cdot 10^8$ células mL⁻¹ (Qualyfix Gramínea, Brasilquímica) nas doses sugeridas pelo fabricante; correspondendo a 4 mL Kg⁻¹ de sementes para inoculação via semente e 600 mL ha⁻¹ para inoculação do solo.

A inoculação das sementes foi realizada no momento da semeadura. As sementes foram colocadas em sacos plásticos, pesadas, adicionado o volume indicado do inoculante e realizada a homogeneização. Para a inoculação via solo o volume de inoculante foi distribuído paralelamente às plantas sobre o solo com auxílio de um pipetador automático aos 30 dias após emergência.

Bioensaio de Casa de Vegetação e Coleta das Amostras

As sementes dos quatro genótipos foram semeadas em vasos com capacidade para 12 dm³ preenchidos com solo do tipo latossolo vermelho eutrófico típico, textura argilosa (Anexo 1).

O ensaio foi conduzido em delineamento experimental de blocos casualizados em esquema fatorial 4 x 6 com três repetições, sendo cada parcela experimental constituída de dois vasos com duas plantas, onde os quatro genótipos foram submetidos aos seguintes tratamentos: 1) Controle, sem inoculação e sem cobertura com N, 2) Inoculação via sementes com *A. brasilense* sem adubação de cobertura com N, 3) Inoculação via sementes e adubação de cobertura com 100 kg de N ha⁻¹, 4) Inoculação via solo sem adubação de cobertura com N, 5) Inoculação via solo e adubação de cobertura com 100 kg de N ha⁻¹, 6) Sem inoculação com adubação de cobertura com 100 kg de N ha⁻¹.

Todos os vasos receberam adubação de base com a formulação N-P-K (8-28-16) de acordo com as recomendações para a cultura e, para os tratamentos que receberam N em cobertura aos 30 dias após emergência (d.a.e.) a fonte utilizada foi ureia (45% de N solúvel). Os vasos receberam irrigação diária e uniforme.

Foi amostrada a terceira folha totalmente expandida contada a partir do ápice (FERREIRA et al., 2002) das duas plantas contidas em cada parcela, aos 55 dias após emergência (FERREIRA et al., 2002; ROESCH et al., 2005; FORNASIERI FILHO, 2007), quando as plantas apresentavam 10 ou 11 folhas totalmente expandidas. As amostras foram envolvidas em papel alumínio, identificadas e imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra freezer, a -70 °C, até o momento do isolamento do RNA total.

Isolamento de RNA total e Tratamento com DNase I

As amostras coletadas correspondentes a cada parcela/genótipo/tratamento foram processadas individualmente para o isolamento do RNA total. Aproximadamente 100 mg de cada amostra foram triturados em almofariz com nitrogênio líquido. Para extração de RNA total foi utilizado 1 mL do reagente TRIzol[®]

Reagent (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA), seguindo-se o procedimento descrito no manual do fabricante e o método desenvolvido por Chomezynski e Sacchi (1987). Ao fim do isolamento as amostras foram armazenados em ultra freezer a - 70 °C.

As amostras de RNA total foram tratadas com DNase I, RNase-free (Thermo Scientific Pittsburgh, PA, USA) conforme instruções do fabricante, para eliminação de eventual contaminação com DNA genômico.

Em uma reação de 20 μ L foi adicionado 2 μ g de RNA total para cada 2 U de DNase I, 2 μ L de tampão 10X, e 2 U de RiboLock RNase Inhibitor. A reação foi incubada em termociclador por 30 min a 37 °C, em seguida adicionado 1 μ L de EDTA 50 mM e incubados novamente a 65 °C por 5 min.

A integridade do RNA foi visualizada em gel de agarose (1,0% m v⁻¹), assim como a ausência de DNA genômico (Figura 1).

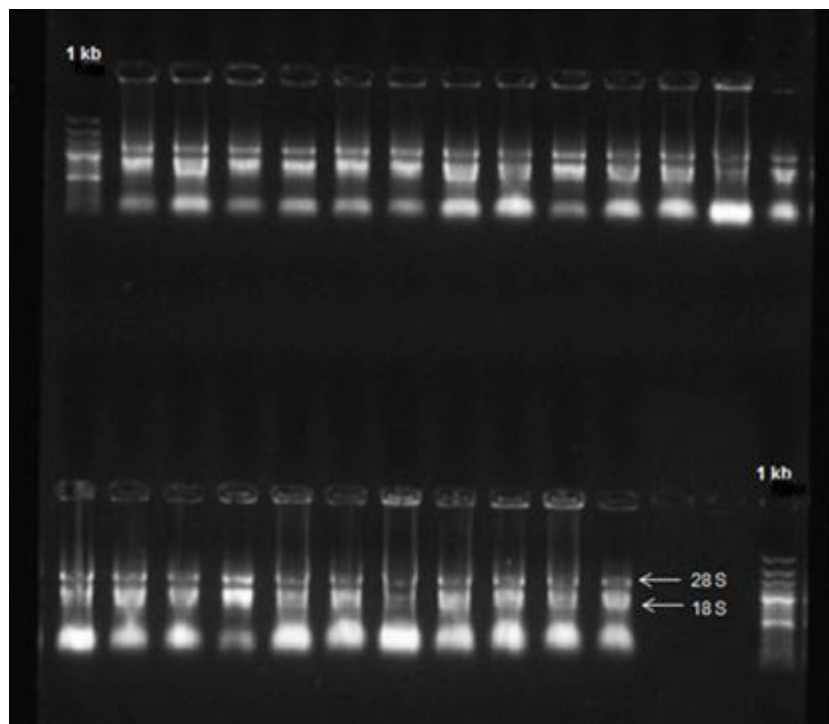


Figura 1. Perfil de qualidade de RNA total extraído de folhas de milho avaliados em gel de agarose (1,0% m v⁻¹) corado com brometo de etídeo (10 mg mL⁻¹)

A quantificação do RNA total de todas as amostras foi realizada com o equipamento NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

Síntese de cDNA

A partir dos RNAs totais tratados com DNase I foi sintetizado o cDNA, de cada tratamento, utilizando-se o kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA, USA) e seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante.

A reação de RT-PCR foi realizada contendo 2 µg de RNA total, 1 µL de *primers* 100 mM oligo (dT)₁₈, sendo o volume de reação completado para 12 µL com água ultra pura livre de nucleases, seguido de incubação a 65 °C por 5 min. Os tubos foram imediatamente acondicionados em banho de gelo, aos quais se adicionou 4 µL do tampão 5X, 1 µL RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL), 2 µL de 10 mM dNTP Mix, 1 µL RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/ µL), para volume total de 20 µL. Após a reação de síntese os cDNAs foram armazenados em ultra freezer a - 70 °C.

Análises da Expressão de *ESTs* em Folhas de Milho por PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

Desenho dos primers

Os *primers* utilizados neste estudo foram desenhados utilizando o programa Primer Express v.2.1 (Applied Biosystems), dentro dos parâmetros aceitáveis para PCR quantitativo em tempo real, estabelecidos para gerar produtos de amplificação de 50 a 150 pb (Primer Express Software v.2.1).

Primers específicos para as *ESTs* da nitrato redutase (*ZmNR*) e da glutamina sintetase (*ZmGln1-3*) de milho, foram gerados com base em sequências disponibilizadas em banco de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) números de acesso : AF153448.1 e X65928.1 (LI et al., 1993; CANÃS et al., 2009), amplificando fragmentos de 124 e 94 pb, respectivamente. O gene da Actina foi escolhido como gene de referência com base em estudos anteriores (ZORB et al., 2005; SHEN et al., 2012) amplificando 128 pb, além de se mostrar estável nas análises de padronização do ensaio (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências dos *primers* e identificação das sequências moldes

Primer	ID da sequência	Sequência 5' - 3'
<i>ZmNR foward</i>	AF153448.1	GCCGAGTCCGACAATTACTAC
<i>ZmNR reverse</i>	AF153448.1	GCGTCGTTATCACCGAGTTTA
<i>ZmGln1-3 foward</i>	X65928.1	GTGGTATGGTATTGAGCAGGAG
<i>ZmGln1-3 reverse</i>	X65928.1	CGCCGATTCCACAGTAGTAAG
<i>ZmActin foward</i>	J01238.1	GCCACGTACA ACTCCATCAT
<i>ZmActin reverse</i>	J01238.1	GACGTGATCTCCTTGCTCATA C

Todos os *primers* foram desenhados de modo que intercalassem introns e exons das sequências moldes descritas, reduzindo a probabilidade de amplificação de DNA genômico, caso houvesse.

A especificidade de cada iniciador foi verificada por meio de alinhamento das suas sequências utilizando a função BLASTn no GenBank (ALTSCHUL et al., 1997). Além disso, foi realizada uma PCR convencional com um pool de cDNAs para verificação da presença de bandas individuais em eletroforese em gel.

PCR quantitativa em tempo real

A análise da expressão quantitativa em tempo real foi realizada no aparelho ABI PRISM 7500 Sequence Detector System (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA).

A eficiência dos ensaios foi analisada com um pool de amostras de cDNAs dos tratamentos em diluição seriada de cDNA (1:10) e dos *primers* para as sequências alvos e de referência. Assim, foi possível observar que a eficiência dos *primers* alvos e do gene de referência apresentaram eficiências próximas e dentro dos limites aceitáveis, viabilizando a utilização dos ensaios. Para calcular a eficiência da reação foi usada a fórmula: $E=[10^{-1/slope}]-1$ (BUSTIN et al., 2009).

As amostras de cDNA utilizadas nas reações constituíam-se de um pool das repetições biológicas sendo representadas por três amostras/tratamento para cada um dos genótipos. Cada reação foi composta 1 μ L de cDNA, 200 η M de cada primer

(forward e reverse), 0,4 µL de ROX Low e 10 µL do KAPA SYBR® **FAST qPCR kit Master mix, com ROX** (Kapa Biosystems, Inc., Boston, MA, USA). O volume final foi ajustado para 20 µL. As condições térmicas da reação foram 2 minutos a 50 °C, 10 min. a 95 °C, seguidos por 40 ciclos de 15 seg. a 95 °C e 1 min. a 60 °C, finalizando com 15 seg. a 95 °C. Após a quantificação relativa, foi feita uma curva de dissociação para verificar a qualidade do produto amplificado. As reações foram feitas em triplicatas, utilizando sempre um controle sem cDNA em cada placa para detectar possíveis contaminações. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Análise e Validação dos Dados

Os resultados foram calculados pelo método do $\Delta\Delta Cq$, em que os dados são normalizados utilizando os valores Cq obtidos para o gene de referência. Cq é definido como o primeiro ciclo de amplificação, em que a fluorescência indica que o produto de PCR é detectado acima do limiar. A normalização foi realizada utilizando a equação: $\Delta Cq = Cq$ (gene alvo) - Cq (gene de referência; actina). A calibração foi determinada pela fórmula $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq$ (amostra) - ΔCq (calibrador). A quantificação relativa (RQ) foi obtida pela fórmula: $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Os dados normalizados obtidos pelos cálculos de quantificação relativa da expressão das ESTs foram submetidos à ANOVA pelo teste de F ($P \leq 0,05$), considerando delineamento inteiramente ao acaso. As médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software Statistical Analysis System v.8 (SAS, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Expressão Quantitativa Relativa de ESTs

ZmNR

A inoculação com *A. brasilense* proporcionou incrementos na expressão de transcritos *ZmNR* para os híbridos AG7098 e 2B707. O mesmo não foi observado para as variedades, sendo que V2 não respondeu a inoculação e, V4 apresentou

maior nível de expressão quando recebeu somente a adubação de cobertura nitrogenada (Figura 2).

Para o AG7098, a inoculação com *A. brasilense* via sementes a.s. (Tratamentos 2 e 3), proporcionou níveis de expressão similares, independentemente da adubação nitrogenada de cobertura. A inoculação via solo foi superior quanto a indução da expressão de *ZmNR*, somente quando combinada com a adubação de cobertura com 100 kg de N ha⁻¹ (tratamento 5), não diferindo do tratamento que recebeu apenas adubação de cobertura com N (Tratamento 6) (Figura 2).

A inoculação via sementes (Tratamento 2) do genótipo 2B707 promoveu incremento significativo no nível de expressão dos transcritos *ZmNR*, seguido dos tratamentos com inoculação via sementes e adubação de cobertura com 100 Kg de N ha⁻¹, inoculação via solo sem adubação de cobertura com N e somente a adubação de cobertura com 100 Kg de N ha⁻¹, respectivamente (Tratamentos 3, 4, e 6) (Figura 2).

De acordo com os resultados, a inoculação via sementes dos dois híbridos avaliados dispensaria adubação de nitrogenada de cobertura, para obter o mesmo nível de expressão de *ZmNR*.

Em relação a V2, foi verificado que a inoculação via sementes não afetou a expressão da *EST ZmNR* mas, na presença de adubação com N em cobertura, observou-se supressão dos transcritos. A inoculação com *A. brasilense* via solo e/ou a adubação nitrogenada de cobertura (Tratamentos 4, 5 e 6) não influenciou a expressão de *ZmNR* (Figura 2). Assim, a variedade V2 não respondeu à inoculação com *A. brasilense*.

Para a variedade V4 foi observado que a inoculação via semente a.s. (Tratamento 2) proporcionou menores níveis de expressão de *ZmNR*. Contudo, a inoculação via solo poderia substituir a adubação nitrogenada de cobertura para induzir os mesmos níveis de transcritos *ZmNR*. O maior valor de expressão foi verificado quando as plantas receberam somente a adubação de cobertura com N (Tratamento 6) (Figura 2). Isso sugere que na variedade V4 o gene *ZmNR* foi superexpresso na presença de N e sem inoculação com *A. brasilense*.

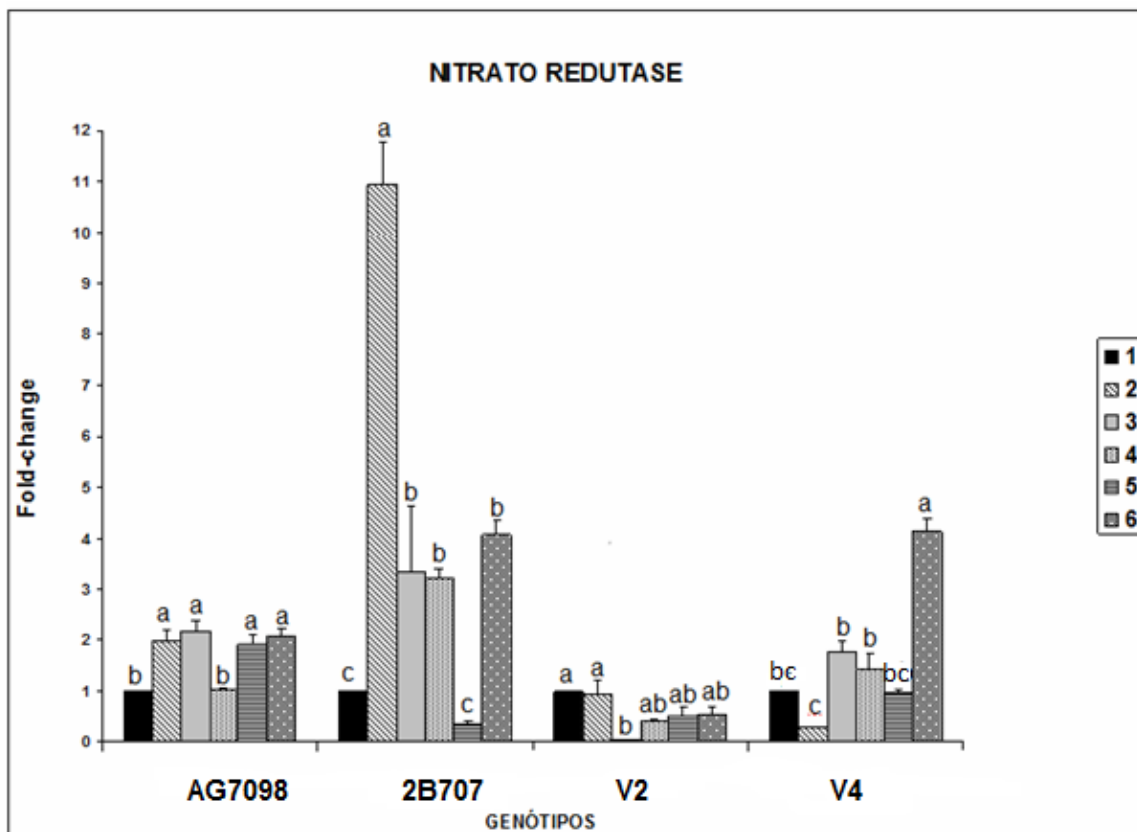


Figura 2. Perfil da expressão quantitativa relativa de nitrato redutase (*ZmNR*) em folhas de milho submetidas a diferentes formas de inoculação com *Azospirillum brasilense* e fornecimento de fertilizante nitrogenado. 1) Controle, sem inoculação e sem cobertura com N, 2) Inoculação via sementes com *A. brasilense* sem adubação de cobertura com N, 3) Inoculação via sementes e adubação de cobertura com 100 kg de N ha⁻¹, 4) Inoculação via solo sem adubação de cobertura com N, 5) Inoculação via solo e adubação de cobertura com 100 kg de N ha⁻¹, 6) Sem inoculação com adubação de cobertura com 100 kg de N ha⁻¹. Colunas representam a indução média de transcritos gênicos relativa ao controle, com valores gerados a partir de RNA de réplicas biológicas. Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo Teste Tukey (0,05). Barras representam erro padrão da média.

De acordo com os resultados, podemos inferir que os incrementos na expressão da *EST ZmNR*, resultantes da inoculação com *A. brasilense*, ocorreu em função de um provável favorecimento do desenvolvimento das raízes conferindo maior poder de exploração do solo e absorção de nutrientes. Neste caso, especificamente de NO₃⁻ sob o qual atua a enzima nitrato redutase, sugerindo efeito indireto da inoculação com *A. brasilense* no metabolismo do N.

Vale ressaltar que a expressão de *ZmNR* corresponde a capacidade da planta em reduzir NO₃⁻ para assimilação do amônio em formas de N orgânico, enquanto a expressão de genes que codificam GS infere sobre a assimilação de N

inorgânico proveniente da fixação biológica ou de reciclagem (MASCLAUX et al., 2000).

Em milho a atividade da enzima NR é induzida pela disponibilidade de NO_3^- (PURCINO et al., 1994). A atividade enzimática da NR foi aumentada em 134,2% com a elevação nas doses de N (75% NO_3^- , 25% NH_3) (MAJEROWICZ et al. 2002).

Em folhas de milho inoculado com *Azospirillum* spp., o aumento na atividade da NR seguidos de acréscimos no teor de N e de produção, podem indicar efeitos devidos a hormônios de crescimento, favorecendo a assimilação de nitrato pela planta. Por outro lado, incrementos de N foliar e produção, sem alteração da atividade da NR, podem ser atribuídos à fixação biológica de nitrogênio (GARCIA DE SALOMONE; DÖBEREINER, 1996).

A atividade enzimática de NR em milho foi induzida quando foi fornecido 100% do N requerido na forma de NO_3^- e, não ocorrendo efeito da inoculação com bactérias *Azospirillum* spp. e *Herbaspirillum* spp. (MACHADO et al., 1998).

A inoculação com *A. amazonense* não influenciou a atividade da enzima NR em milho mas, ao se fornecer N com formulação predominantemente na forma nítrica, a atividade da NR foi induzida (REIS JUNIOR et al., 2008).

Analisando as respostas dos genótipos dentro dos tratamentos aplicados, verificou-se que o híbrido AG7098 foi superior na expressão de *ZmRN* quando recebeu a inoculação com *A. brasilense* via solo e adubação nitrogenada de cobertura (Figura 3).

O híbrido 2B707 mostrou-se superior quanto a expressão de transcritos *ZmRN* quando submetido aos tratamentos 2, 3 e 4, indicando efeito positivo da inoculação com *A. brasilense* via sementes e solo neste genótipo (Figura 3).

As variedades apresentaram subexpressão de transcritos *ZmRN* ao serem submetidas ao tratamento com inoculação via sementes na ausência de adubação nitrogenada de cobertura (Tratamento 2). De maneira geral, as variedades responderam negativamente ou não responderam a inoculação com *A. brasilense*, ao se comparar os genótipos dentro de tratamentos. Comparando todos os genótipos, a variedade V2 apresentou os menores valores de expressão de *ZmRN* para todas as formas de inoculação e fornecimento de N via fertilizante, com exceção do tratamento 5 (Figura 3).

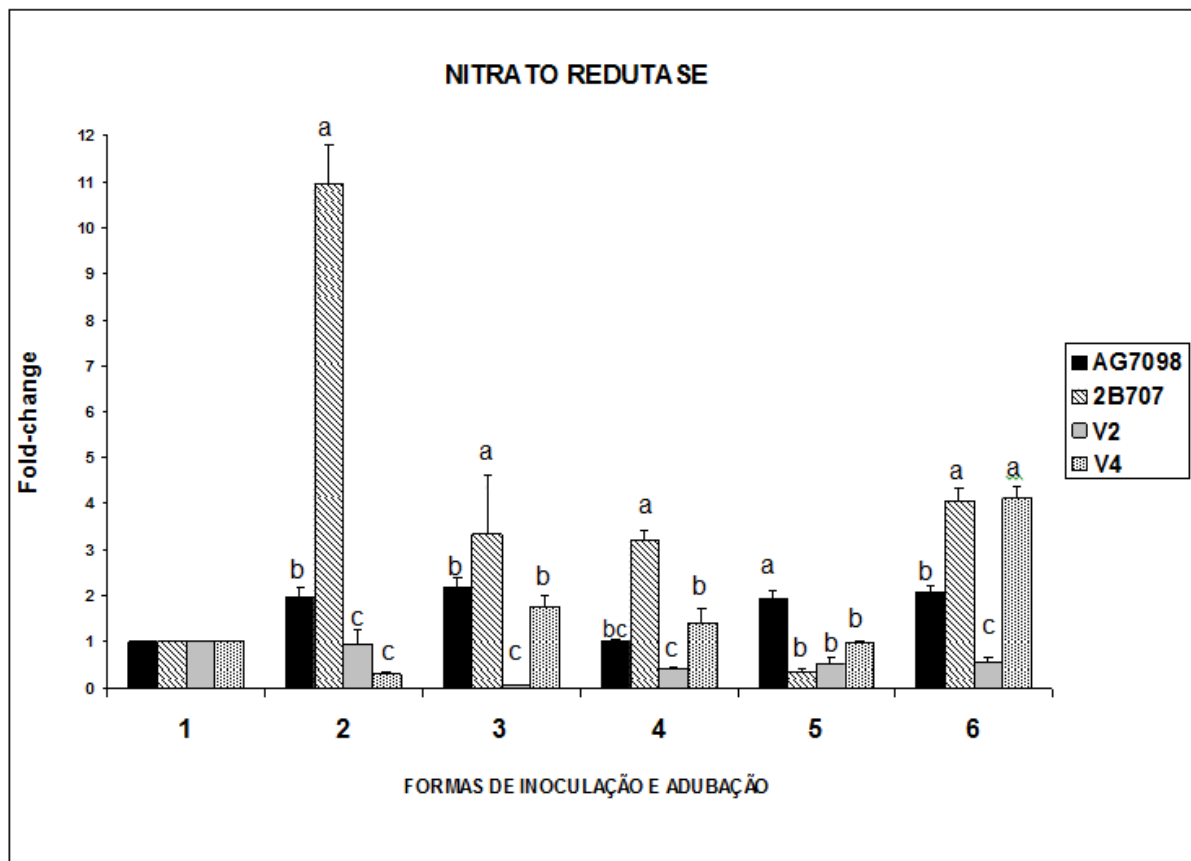


Figura 3. Perfil da expressão quantitativa relativa de nitrato redutase (*ZmNR*) em folhas genótipos de milho dentro dos tratamentos aplicados: 1) Controle, sem inoculação e sem cobertura com N, 2) Inoculação via sementes com *A. brasilense* sem adubação de cobertura com N, 3) Inoculação via sementes e adubação de cobertura com 100 kg de N ha⁻¹, 4) Inoculação via solo sem adubação de cobertura com N, 5) Inoculação via solo e adubação de cobertura com 100 kg de N ha⁻¹, 6) Sem inoculação com adubação de cobertura com 100 kg de N ha⁻¹. Colunas representam a indução média de transcritos gênicos relativa ao controle, com valores gerados a partir de RNA de réplicas biológicas. Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo Teste Tukey (0,05). Barras representam erro padrão da média.

A resposta diferenciada de genótipos à inoculação com bactérias diazotróficas é explicada pelas influências de diversos fatores, dentre os quais o genótipo e estado fisiológico da planta e da bactéria, as condições ambientais como luz, temperatura, além dos aspectos físico-químicos do solo como aeração, umidade, microbiota e disponibilidade de N, os quais podem afetar o sucesso da associação (DOBBELAERE et al., 2001; QUADROS, 2009).

Da mesma forma, a expressão de genes que codifica a nitrato redutase pode ser regulada por fatores genéticos e fisiológicos da planta e, também, é fortemente relacionado com fatores ambientais (CAO et al., 2008)

ZmGln1-3

Para os híbridos AG7098 e 2B707 e para a variedade V4, a inoculação com *A. brasilense* induziu a expressão de transcritos *ZmGln1-3*. A variedade V2 não respondeu à inoculação.

Os maiores níveis de expressão da *EST ZmGln1-3* em folhas do híbrido AG7098 foram constatados para os tratamentos 3 e 6 seguido do tratamento 2, sugerindo efeito positivo da inoculação via sementes para este genótipo (Figura 4).

Para o híbrido 2B707 foi observado que com as duas formas de inoculação, a.s. ou 30 d.a.e., houve superexpressão de transcritos de *ZmGln1-3*, na ausência de N em cobertura (Tratamentos 2 e 4), sugerindo que a aplicação do N pode inibir a atividade da bactéria (Figura 4). Assim, fica evidente a contribuição *A. brasilense* para indução da expressão do gene. O tratamento 6 também apresentou superexpressão de *ZmGln1-3*.

Estes resultados corroboram com o relato de STEENHOUDT; VANDERLEYDEN (2000), que bactérias do gênero *Azospirillum* fixam N atmosférico quando se encontram em condições microaeróbicas e com limitação de nitrogênio.

Para a variedade V2, o perfil de expressão quantitativa relativa das *ESTs ZmRN* e *ZmGln1-3* foram semelhantes para todos os tratamentos avaliados (Figura 3 e 4). A inoculação via sementes mais cobertura nitrogenada para o genótipo V2 (Tratamento 3) proporcionou subexpressão de *ZmGln1-3*. Nota-se que a variedade V2 não responde a inoculação com *A. brasilense*, quanto a indução da expressão do gene *ZmGln1-3* (Figura 4). Com isso, podemos concluir que a associação entre o genótipo V2 e as estirpes AbV5 e AbV6 de *A. brasilense* não é eficiente no sentido de promover a FBN, considerando *ZmGln1-3* como marcador para o processo de FBN.

Para a variedade V4, verificou-se que a inoculação via sementes mais adubação de cobertura com N (Tratamento 3) induziu maiores níveis de expressão de *ZmGln1-3*, seguido do tratamento 4. De acordo com estes resultados, a variedade V4 responde significativa e positivamente à inoculação com *A. brasilense* para aumento da expressão de *ZmGln1-3*. Para indução de transcritos de *ZmGln1-3*, se realizada a inoculação vai solo, o fornecimento de N em cobertura pode ser dispensado (Figura 4).

Assim como foi verificado para o híbrido 2B707, os resultados obtidos com a variedade V4 também indicam que o fornecimento de N em cobertura inibe a atividade da bactéria.

A presença de bactérias fixadoras de N pode induzir maior atividade de enzimas GS, sendo que quando em associações simbióticas eficientes, ocorre maior disponibilização de NH_4^+ para as plantas (MACHADO et al., 1998).

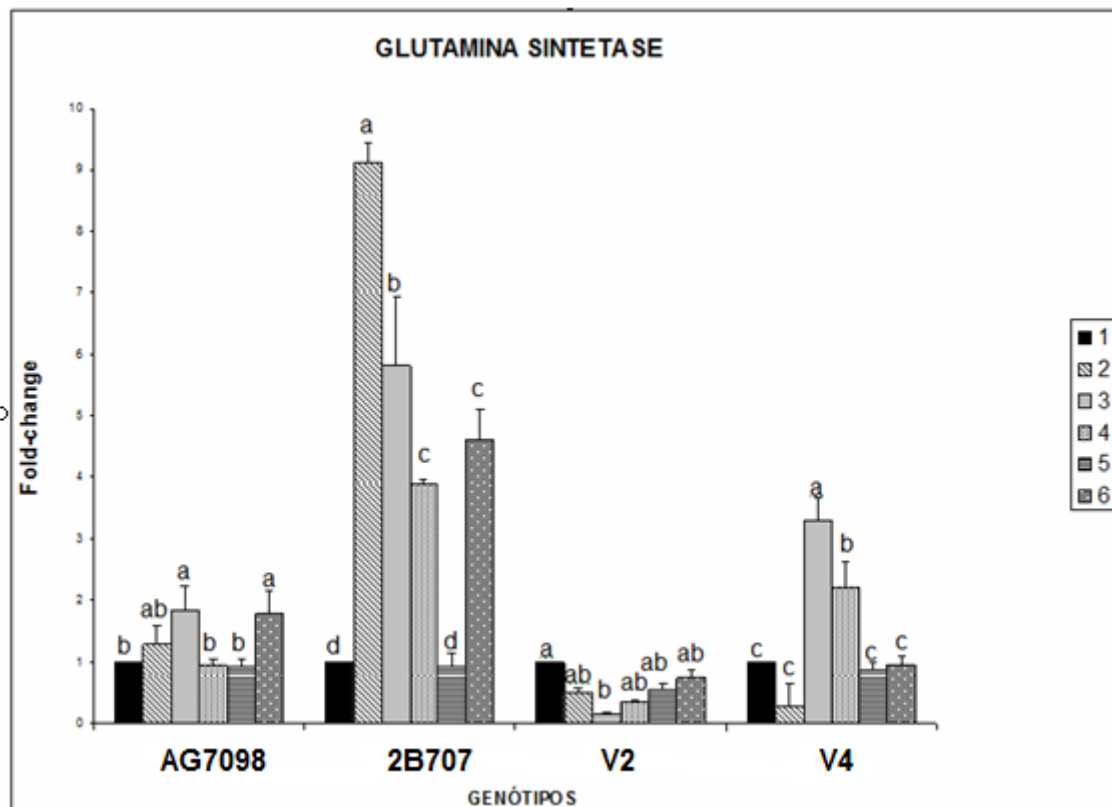


Figura 4. Perfil da expressão quantitativa relativa de glutamina sintetase (ZmGln1-3) em folhas de milho submetidas a diferentes formas de inoculação com *Azospirillum brasilense* e fornecimento de fertilizante nitrogenado. 1) Controle, sem inoculação e sem cobertura com N, 2) Inoculação via sementes com *A. brasilense* sem adubação de cobertura com N, 3) Inoculação via sementes e adubação de cobertura com 100 kg de N ha⁻¹, 4) Inoculação via solo sem adubação de cobertura com N, 5) Inoculação via solo e adubação de cobertura com 100 kg de N ha⁻¹, 6) Sem inoculação com adubação de cobertura com 100 kg de N ha⁻¹. Colunas representam a indução média de transcritos gênicos relativa ao controle, com valores gerados a partir de RNA de réplicas biológicas. Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo Teste Tukey (0,05). Barras representam erro padrão da média.

Analisando o comportamento dos genótipos dentro dos tratamentos aplicados, observou-se que a inoculação via sementes, a inoculação via sementes mais adubação de cobertura com N e a inoculação via solo mais adubação de

cobertura (Tratamentos 2, 3 e 4) proporcionaram o mesmo perfil de expressão para as duas *ESTs* avaliadas em relação a todos os quatro genótipos (Figura 5).

O híbrido AG7098 apresentou expressão relativa de *ZmGln1-3* significativamente induzida quando recebeu os tratamentos 2 e 6 se comparado as variedades, não sendo superior ao 2B707 para nenhum dos tratamentos (Figura 5).

O híbrido 2B707 mostrou-se superior quanto a expressão de transcritos *ZmGln1-3* quando submetido aos tratamentos 2, 3, 4 e 6, indicando efeito positivo da inoculação deste genótipo com *A. brasilense* (Figura 5). Neste caso, os maiores valores de expressão de *ZmGln1-3* podem estar diretamente relacionados a disponibilização de NH_4^+ .

As variedades apresentaram subexpressão de transcritos *ZmGln1-3* ao serem inoculadas via sementes via sementes e na ausência de adubação nitrogenada de cobertura (Tratamento 2). Comparada aos demais genótipos, a V2 apresentou subexpressão de *ZmGln1-3* para todas as formas de inoculação e fornecimento de N via fertilizante com exceção do tratamento 5 (Figura 5).

A indução da atividade de enzimas GS em milho foi verificada em regimes de alto e baixo nível de N, onde o aumento de nitrogênio foliar foi proporcional a atividade de GS (HIREL et al, 2005b).

A variedade V4 apresentou maior nível de expressão de *ZmGln1-3*, em relação ao AG7098 e a V2, quando submetida aos tratamentos 3 e 4, sugerindo melhor resposta à inoculação com *A. brasilense*.

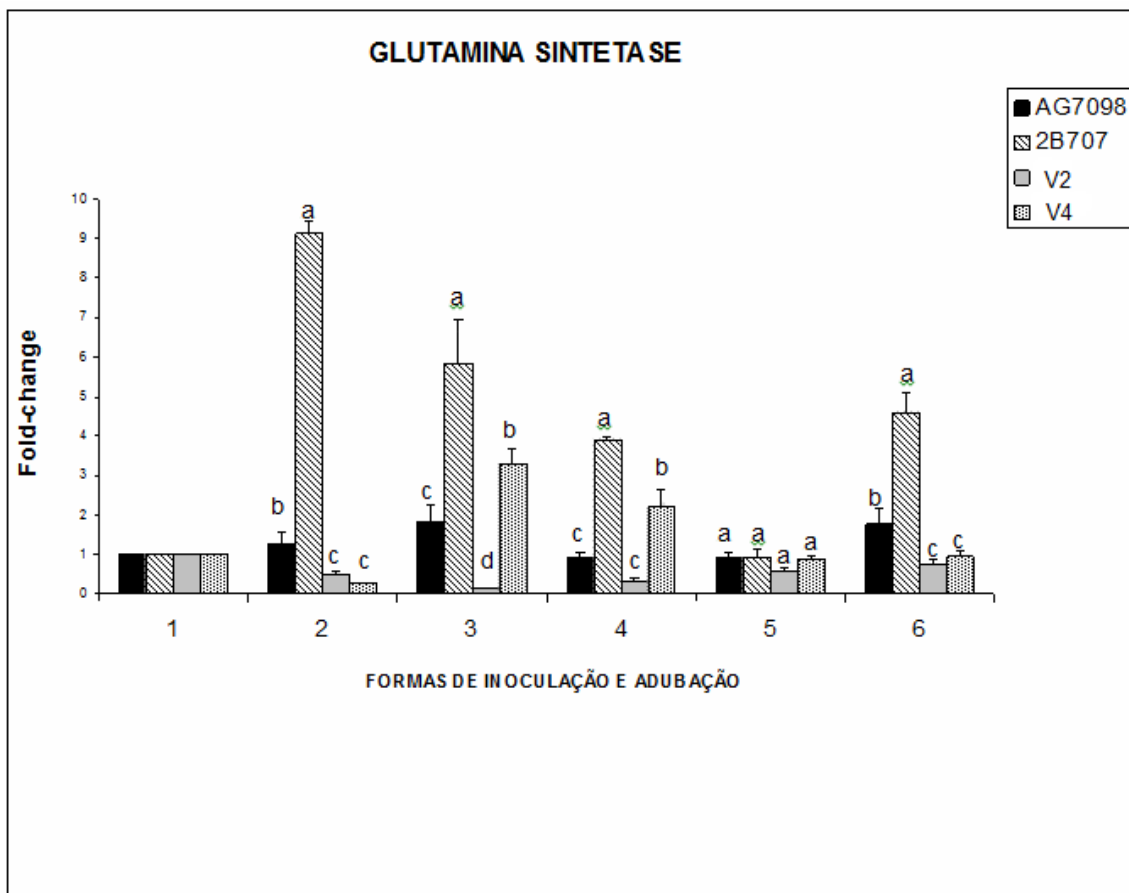


Figura 5. Perfil da expressão quantitativa relativa de glutamina sintetase (ZmGln1-3) em folhas genótipos de milho dentro dos tratamentos aplicados: 1) Controle, sem inoculação e sem cobertura com N, 2) Inoculação via sementes com *A. brasilense* sem adubação de cobertura com N, 3) Inoculação via sementes e adubação de cobertura com 100 kg de N ha⁻¹, 4) Inoculação via solo sem adubação de cobertura com N, 5) Inoculação via solo e adubação de cobertura com 100 kg de N ha⁻¹, 6) Sem inoculação com adubação de cobertura com 100 kg de N ha⁻¹. Colunas representam a indução média de transcritos gênicos relativa ao controle, com valores gerados a partir de RNA de réplicas biológicas. Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo Teste Tukey (0,05). Barras representam erro padrão da média.

Em milho, foi observado que genes que codificam GS1 (*gln1-3*), apresentaram maior expressão em folhas independentemente de doses de N e da idade (HIREL et al.; 2005a, 2005b).

Quando *gln1-3* foi superexpressa constitutivamente em folhas de milho, a produtividade de grãos aumentou consideravelmente (30%), corroborando com o fato de que a enzima GS1 tem relação relevante com a produção de grãos em milho (MARTIN et al., 2006).

O fornecimento de N na forma amoniacal para plantas de milho promoveu o aumento na atividade de enzimas GS, mas o mesmo não foi observado em plantas

na presença de *A. amazonenses*, pois não influenciou a atividade de GS (REIS JUNIOR et al, 2008).

Diferentemente, a atividade da GS foi superior em raízes de plantas de milho inoculadas com *Azospirillum* spp. e *Herbaspirillum* spp., sendo o aumento correlacionado positivamente com o crescimento bacteriano (MACHADO et al., 1998).

Geralmente, associações simbióticas induzem ou suprimem a expressão de genes de rotas metabólicas fundamentais relacionadas à assimilação de N ativas também em tecidos não simbióticos (BAILLY et al., 2007)

CONCLUSÕES

- 1- Os genótipos diferem quanto à resposta à inoculação com *A. brasilense*.
- 2- Os híbridos têm a expressão de *ZmNR* e *ZmGln1-3* induzidas pela inoculação com *A. brasilense*
- 3- A variedade V2 não apresenta a expressão de *ZmNR* induzida quando inoculada com *A. brasilense*, o contrário ocorre para expressão de transcritos *ZmGln1-3*.
- 4- A variedade V4 responde negativamente ou não respondem a inoculação com *A. brasilense* quanto a expressão de *ZmGln1-3*.

REFERÊNCIAS

AMARAL, F.P.; BUENO, J.C.F.; HERMES, V.S.; ARISI, A.C.M. Gene expression analysis of maize seedlings (DKB240 variety) inoculated with plant growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae*, **Symbiosis**, DOI 10.1007/s13199-014-0270-6, 2014.

ALTSCHL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v.25,p.3389-3402, 1997.

BAILLY, J.; DEBAUD, J.C.; VERNER, M.C.; PLASSARD, C.; CHALOT, M.; MARMEISSE, R.; FRAISSINET-TACHET, L. How does a symbiotic fungus modulate expression of its host-plant nitrite reductase? **New Phytologist**, v.175, p. 155–165, 2007.

BALDANI, J.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOE, S.R.; DÖBEREINER, J.. Recent Advances in bnf with Non-Legume Plants. **SoitB idt.B iochem**, 29, 516, p. 911-922, 1997.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 77, 3, p. 549-579, ISSN 0001-3765, 2005.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003) *Can. J. Microbiol.*, v.50, p. 521–577, 2004.

BERNARD, S.M.; HABASH, D.Z.. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. **New Phytologist**, 182, p. 608–620, 2009.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367p.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C.T. The MIQE Guidelines: *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* *Clinical Chemistry* v. 55, p. 611–622, 2009.

CAÑAS, R. A.; QUILLERÉ, I.; CHRIST, A.; HIREL, B.. Nitrogen metabolism in the developing ear of maize (*Zea mays*): analysis of two lines contrasting in their mode of nitrogen management **New Phytologist**, 184, p. 340–352, doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02966, 2009.

CARVALHO, R.P.; VON, PINHO R.G.; DAVIDE, L.M.C. Desempenho de Cultivares de Milho Quanto à Eficiência de Utilização de Nitrogênio, **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, 10, 2, p. 108-120, ISSN 1980-6477, 2011.

CAO, Y.; FAN, X-R.; SUN, S-B.; XU, G.; HU, J.; SHEN Q-R. Effect of Nitrate on Activities and Transcript Levels of Nitrate Reductase and Glutamine Synthetase in Rice. **Pedosphere**, v.18, p. 664–673, 2008.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, 162, 1, p.156-159, 1987.

DALLA SANTA, O.R.; SOCCOL, C.R.; RONZELLI JUNIOR, P.; HERNÁNDEZ, R.F.; ALVAREZ, G.L.M.; DALLA SANTA, E.S.; PANDEY, A. Effects of inoculation of *Azospirillum* sp. in maize seeds under field conditions. **Food, Agriculture & Environment**, v. .2, p. 238-242, 2004.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, P.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; AGUIRRE, J.F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; BURDMAN, S.; KADOURI, D.; SARIG, S. & OKON, Y. Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Aust. J. Plant Physiol.**, v.28, p.871-879, 2001.

DÖBEREINER, J.. Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions. **Soil Bid. Biochem.**, 29, 36, p. 771-774, 1997.

FERREIRA, V.M.; MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M.; OLIVEIRA, L.E.M.; PURCINO, A.A.C.. Metabolismo do nitrogênio associado à deficiência hídrica e sua recuperação em genótipos de milho, **Ciência Rural**, 32, 1, p.13-17, 2002.

FORNASIERI FILHO, D. **Manual da Cultura do Milho**. Jaboticabal: Funep, 576 p., 2007.

GARCIA DE SALAMONE, I.E.; DOBEREINER J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biol Fertil Soils**, v. 21, p.193-196, 1996.

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

HIREL, B.; ANDRIEUB, B.; VALADIERA, M.H.; RENARDA, S.; QUILLERE´, A I.; CHELLEB, M.; POMMELB, B.; FOURNIERB, C.; DROUETB, J.L.. Physiology of maize II: Identification of physiological markers representative of the nitrogen status of maize (*Zea mays*) leaves during grain filling. **Physiologia Plantarum**, 124, p. 178–188, ISSN 0031-9317, 2005a.

HIREL, B.; MARTIN, A.; TERCE´-LAFORGUE, T.; GONZALEZ-MORO, M.B.; ESTAVILLO, J.M. Physiology of maize I: a comprehensive and integrated view of nitrogen metabolism in a C4 plant. **Physiol Plant**, 124: 167–177, ISSN 0031-9317, 2005b.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil **Plant Soil**, v.331, p. 413–425, 2010.

LANA, M.C.; DARTORA, J.; MARINI, D.; HANN, J.E. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize, **Rev. Ceres**, Viçosa, 59, 3, p.399-405, 2012.

LI, M.G.; VILLEMUR, R.; HUSSEY, P.J.; SILFLOW, C.D.; GANTT, J.S.; SNUSTAD, D.P.. Differential expression of six glutamine synthetase genes in *Zea mays*. **Plant Molecular Biology**, 23, p. 401-407, 1993.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D.. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-DDCT} Method. **Methods**, 25, p. 402–408, doi:10.1006/meth.2001.1262, 2001.

MACHADO, A.T.; SODEK, L.; DOBEREINER, J.; REIS, V.M.. Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho Nitroflint. **Pesq. Agropec Brasileira**, 33, p.961-970, 1998.

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 em melhoradas de milho. *Revista Brasil. Bot.*; v.25, p.129-136, 2002.

MARTIN, A.; LEE, J.; KICHEY, T.; GERENTES, D.; ZIVY, M.; TATOUT, C.; DUBOIS, F.; BALLIAU, T.; VALOT, B.; DAVANTURE, M.; TERCE´-LAFORGUE, T.; QUILLERE´, I.; COQUE, M.; GALLAIS, A.; GONZALEZ-MORO, M.B.; BETHENCOURT, L.; HABASH, D.Z.; LEA, P.J.; CHARCOSSET, A.; PEREZ, P.; MURIGNEUX, A.; SAKAKIBARA, H.; EDWARDS, K.J.; HIREL, B.. Two Cytosolic Glutamine Synthetase Isoforms of Maize Are Specifically Involved in the Control of Grain Production. **The Plant Cell**, 18, P. 3252–3274, 2006.

MASCLAUX, C.; VALADIER, M.H.; BUGIÈRE, N.; MOROT-GUAUDRY, J.F.; HIREL, B. Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum*L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. **Planta**, v.211, p. 510-518, 2000.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; DANIEL-VEDELE, F.; DECHORGNAT, J.; CHARDON, F.; GAUFICHON, L.; SUZUKI, A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. **Annals of Botany** 105: 1141–1157, 2010.

MORRISON, K.M.; SIMMONS, S.J.; STAPLETON, A.E. Loci controlling nitrate reductase activity in maize: ultraviolet-B signaling in aerial tissues increases nitrate reductase activity in leaf and root when responsive alleles are present. **Physiologia Plantarum**, v.140, p.334–341, 2010.

NOVOA, R.; LOOMIS, R. S.. Chapter 7: Nitrogen And Plant Production In: **Plant And Soil**, 58, p.177-204, 1981.

PURCINO, A.A.C.; MAGNAVACA, R.; MACHADO, T.; MARRIEL, I.E.. Atividade da redutase do nitrato em genótipos antigos e modernos de milho, cultivados sob dois níveis de nitrogênio. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, 6, 1, p. 41-46, 1994.

QUADROS, P.D. Inoculação de *Azospirillum* spp. em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul. 2009, 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

ROESCH, L.F.; CAMARGO, F.; SELBACH, P.; SÁ, E.S. PASSAGLIA, L.. Identificação de cultivares de milho eficientes na absorção de nitrogênio e na associação com bactérias diazotróficas. **Ciência Rural**, 35,4, p. 924-927, 2005.

REIS JUNIOR, F.B.; MACHADO, C.T.T.; MACHADO, A.T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **R. Bras. Ci. Solo**, v.32, p.1139-1146, 2008.

SOLOMONSON, L.P.; BARBER, M.J. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.**, v.41, p.225-253, 1990.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **User's guide : statistic**. 6.ed. Cary, 1999. 956p.

SHEN, Y.; JIANG, Z.; YAO, X.; ZHANG, Z.; LIN, H. Genome Expression Profile Analysis of the Immature Maize Embryo during Dedifferentiation. **PLoS ONE**, 7, 3, doi:10.1371/journal.pone.0032237, 2012.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiol Rev.**, v.24, p.487–506, 2000.

WALKER, V.; COUILLEROT, O.; VON FELTEN, A.; BELLVERT, F.; JANSA J.; AURHOFER M.; BALLY R.; MOËNNE-LOCCOZ Y.; COMTE G.. Variation of secondary metabolite levels in maize seedling roots induced by inoculation with Azospirillum, Pseudomonas and Glomus consortium under field conditions. **Plant Soil**, 356, p.151–163, doi: 10.1007/s11104-011-0960-2, 2012.

YADAV, S.; YADAV, J.; SINGH, G.S..Performance of *Azospirillum* for Improving Growth, Yield and Yield Attributing Characters of Maize (*Zea mays* L.) in Presence of Nitrogen Fertilizer **Research Journal of Agricultural Sciences**, 2, , p. 139-141, 2011.

XU, G.; FAN, X.; MILLER, A.J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v.63, p.153-182, 2012.

ZORB, C.; NOLL, A.; KARL, S.; LEIB, K.; YAN, F.; SCHUBERT, S. Molecular characterization of Na⁺/H⁺ antiporters (ZmNHX) of maize (*Zea mays* L.) and their expression under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, 162, p.55-66, 2005.

CAPÍTULO 4 – Considerações finais

Independentemente da forma como os genótipos responderam à inoculação com *A. brasilense* em relação à expressão das ESTs *ZmNR* e *ZMGln1-3* é válida a principal teoria de que associações eficientes têm capacidade de promover crescimento radicular, por meio da produção de fitohormônios que melhoram o crescimento de raízes e, conseqüentemente melhoram a absorção de água e nutrientes do solo, inclusive nitrogênio. Por outro lado, a indução de desenvolvimento de parte aérea está diretamente relacionada com o aumento de produção de biomassa, aumentando o potencial produtivo das plantas.

De modo geral, os genótipos avaliados responderam à inoculação com *A. brasilense*, mas de maneira particular. Diante das correlações positivas observadas entre *A. brasilense* e a cultura do milho seria interessante delinear um programa de melhoramento visando selecionar genótipos com potencial para responder à interação com estas bactérias, a fim de gerar incrementos de produtividade e, possivelmente reduzir o volume das aplicações de fertilizantes nitrogenados.

O mesmo pode ser feito em relação às estirpes de *A. brasilense*, com intuito de selecionar bactérias com maior potencial de associação com genótipos de milho, garantindo que os benefícios já demonstrados em diversos estudos sejam atribuídos e apurados na cultura do milho.

