



FERNANDO R. O. CANTÃO¹; FREDERICO O. M. DURÃES²; PAULO C. MAGALHÃES²;
IVANILDO E. MARRIEL²; ELTO E. G. E GAMA²; ANTONIO C. DE OLIVEIRA²

¹Agronomando, UFLA-Universidade Federal de Lavras; Estagiário, Embrapa Milho e Sorgo;

²Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151 – CEP 35701-970 – Sete Lagoas,
MG, Brasil (*Contactos:* fduraes@cnpms.embrap.br).

INTRODUÇÃO

A seleção de materiais mais eficientes no uso de N tem sido buscado tanto na agricultura capitalizada como na agricultura de baixos insumos. Isto porque os desperdícios e a escassez desse elemento mineral que é o mais exigido pelas plantas (Marschner, 1995), podem gerar problemas econômicos, ambientais, de saúde pública e de segurança alimentar. Várias estratégias podem ser tomadas no intuito de aumentar a eficiência no uso de N. Uma das mais simples é a redução das doses de adubos, para níveis que sejam produtivos e seguros (Fernández et al., 1998). Uma outra estratégia que pode ser tomada é o melhoramento genético de materiais com uma maior eficiência ao uso de N. A seleção desses materiais é feita principalmente com base na produção, mas características secundárias, de alta herdabilidade e correlacionadas com a produção podem acelerar o processo (Bänziger et al., 1995, 1997, 1999). As características secundárias mais utilizadas e estudadas tem sido teor de clorofila da folha da espiga, altura de planta e inserção da primeira espiga, senescência foliar (Lafitte & Edmeades, 1994), prolificidade e IFMF (intervalo entre florescimento masculino e feminino) (Durães et al., 1997), fluorescência da clorofila (Durães et al., 2002). Objetivou-se avaliar linhagens do BAG (Banco Ativo de Germoplasma), da Embrapa Milho e Sorgo/CNPMS-Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, quanto a eficiência no uso de N (*EUN**), utilizando como ferramentas um padrão visual de verde foliar, teor de clorofila (analítico, por três metodologias, e indiretamente, através do medidor portátil de clorofila), N-total e produção de grãos. Objetivou-se ainda correlacionar estes parâmetros com o objetivo de criar uma metodologia de baixo custo, rápida e com uma boa precisão para se avaliar preliminarmente genótipos de milho, quanto a sua performance para nitrogênio.

* **EUN, eficiência de uso de N:** a razão entre mg matéria seca de planta/mg de N na planta e a razão entre mg de CO₂ fixado/mg de N na planta (Larcher, 2000; Medici, 2003). Em milho, Moll et al. (1982) definiram a eficiência ao uso de N como massa de grãos dividida pela massa de N aplicada no solo (Gw/Ns). A eficiência no uso de N (EUN) seria o produto da eficiência na absorção pela eficiência na utilização. Materiais mais EUN apresentam menor diferença de resposta produtiva em alto e baixo N (Rosielle & Hamblin, 1981). O comportamento diferencial de genótipos, durante a mudança de níveis de N disponível às plantas, indica diferentes mecanismos relacionados ao uso e eficiência de N, pois materiais que interagem diferencialmente com N expressam o sinal de que diferentes genes estão sendo usados por cada um deles nos ambientes com níveis diferentes de N. O nitrogênio é um dos nutrientes mais exigidos pela cultura do milho, e sua utilização vem aumentando gradativamente com o aumento do potencial genético das cultivares. Carlone e Russel (1987), comparando híbridos de milho de diferentes épocas de comercialização, constataram que os híbridos mais antigos, apresentaram comparativamente aos híbridos mais recentes, baixa resposta às doses crescentes de nitrogênio. Materiais nitrogênio responsivos e/ou eficientes constitui-se em uma forte estratégia para o melhoramento de milho. Também, a deficiência de nitrogênio na cultura do milho é possível de ser corrigida no mesmo ciclo. Plantas de milho com deficiência de nitrogênio apresentam folhas mais velhas amareladas e com um "V" esbranquiçado ao longo da nervura principal e espigas deformadas na ponta. Coelho et al. (1992), concluíram que houve pronunciada resposta do milho a aplicação de nitrogênio, com um incremento de 80% no rendimento de grãos da dose 0 para 120 kg/hectare de N. A escolha da cultivar mais adequada a cada situação é o fator de acréscimo na produtividade, que pode ser obtido sem custo adicional no sistema de produção.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido a campo na Embrapa Milho e Sorgo em um LVE ("sítio" ambiental para baixo N, "cascata") e foram avaliadas 145 linhagens para uso e eficiência de nitrogênio, sendo 144 genótipos do BAG-Milho e 1 genótipo controle (população CMS-28), em linhas intercalares de blocos de 12 genótipos, na estação de crescimento do ano de 2003/2004. As sementes foram plantadas manualmente. O estande inicial foi constituído por linhas de 5 m de comprimento com 25 plantas por parcela, com espaçamento entre plantas de 0,20m e entre linhas de 0,50m. Não foi feita adubação de N em plantio ou cobertura. O experimento foi instalado em látice simples 12x12, com duas repetições. Neste trabalho serão apresentadas as avaliações feitas durante o estágio fenológico de pleno florescimento (masculino e feminino). As análises do teor foliar de clorofila constaram de dois métodos indiretos: escore visual e clorofilômetro (Modelo SPAD 502, MINOLTA); e, de três métodos diretos analíticos: Arnon (1949), Lichtenthaler (1987) e Porra (1989). As análises indiretas constaram de escores visuais no dossel das plantas na parcela, que variavam de 1 a 5 de acordo com um padrão visual de cor (verde a amarelo) na superfície foliar, sendo assim definido: escore visual 1 (de 100% a 80% de teor de clorofila, correspondendo a plantas com uma coloração *verde escuro*). A nota 1 (100%) representa uma planta bem nutrida sem restrição de N; escore visual 2 (teor de 80% a 60% de clorofila, expresso na planta como um verde; escore visual 3 (de 60% a 40% de teor de clorofila, manifestado na planta como um verde-amarelado; escore visual 4 (de 40% a 20% de teor de clorofila, e expressado como um tom foliar amarelado-verde; e, a escore visual 5 (de 20% a 0% de teor de clorofila, em plantas de cor completamente amareladas e avançado estágio de morte de tecidos, significando senescência foliar. Através do clorofilômetro mediram-se o teor de clorofila utilizando-se dois padrões foliares: folha bandeira e folha adjacente à espiga (folha superior e oposta à espiga). As leituras foram feitas com 30 leituras por parcela, utilizando o terço médio da folha a 2 cm da margem da folha, como descrito em Argenta et al. (2001). Com base nos valores médios do clorofilômetro, por genótipo, construiu-se o índice de suficiência de N (ISN, índice de suficiência de N = 100*média de leituras SPAD por genótipo/maior média de leituras SPAD referência), que traduz a suficiência (planta bem nutrida em N) ou a necessidade de N (planta com estresse de N). As determinações

diretas analíticas foram realizadas utilizando-se o mesmo material foliar em que foram feitas as leituras com o clorofilômetro. O teor de nitrogênio total foi determinado em amostras retiradas das mesmas folhas em que foram obtidos os teores de clorofila. As amostras coletadas foram secas em estufas a 72°C, por 4 dias. Após a secagem, as amostras foram moídas e enviadas para o laboratório, para determinação do N total, através do *sistema F.I.A.- Flow Injection Analysis*, descrito por Zagatto et al. (1981) e Silva (1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização de linhagens de milho visando uso e eficiência de N e a identificação de métodos diretos e indiretos para avaliação da performance de N em plantas de milho estão apresentadas nas Tabela 1 e Figura 1. A Tabela 1 mostra as variáveis descritoras de 145 (inclui linhagem controle) genótipos de milho cultivados sob baixo nível de nitrogênio. As correlações significativas ($\alpha=0,05$) de variáveis avaliadas por métodos aferidores do teor de N em plantas podem ser observadas na Tabela 2. As correlações entre a diferenciação de coloração do verde foliar (expressa pela escala visual de notas, *EVN*) e o teor de clorofila foliar (métodos diretos e indiretos) foram significativas, ao nível de 5% de probabilidade. Também, foram significativas, as correlações entre o teor de clorofila na folha adjacente a espiga (*SPADa*) e na folha bandeira (*SPADb*) e a concentração de nitrogênio, bem como as correlações entre a escala visual de notas e teor de clorofila na folha adjacente a espiga e produção de grãos. As correlações entre *SPADa* e *SPADb* indicam similares respostas entre os dois órgãos amostrados, entretanto, recomenda-se que, em se tratando de linhagens, sejam amostradas as folhas adjacentes da espiga para análises fisiológicas, porque a folha bandeira normalmente é de limbo foliar pequeno, e às vezes irregular por formação ou pragas. Isto é particularmente indicado para análises visuais ou destrutivas. A Figura 1 demonstra que, por se tratar de linhagens, e de expressarem respostas variadas a nitrogênio, com indicativos de mecanismos diferenciados de eficiência, pode-se ampliar estes estudos visando melhor reconhecer esta variabilidade.

CONCLUSÕES

O material genético utilizado apresenta variabilidade para a característica uso e eficiência de N. Performances (vegetativa e reprodutiva) distintas caracterizam diferentes mecanismos de plantas de milho para uso e eficiência de N. Métodos rápidos indiretos estão correlacionados com métodos analíticos diretos de aferição de N. Sob manejo orientado, método indireto constitui-se potente ferramenta indicadora do estado nutricional de N. Estado nutricional de N está correlacionado com produção de fitomassa total e rendimento de grãos em milho.

LITERATURA CITADA

- ARGENTA, GILBER.; SILVA, P.R.F.; BORTOLONI, C.G.; FORSTHORFER, E.L.; STRIEDER, M.L. Relação da leitura do Clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. v.13, n.2, 2001.
- ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24:1-15. 1949.

- BÄNZIGER, M.; BETRÁN, F.J. & LAFITTE, H.R. Efficiency of high-nitrogen selection environments for improving maize for low-nitrogen target environments. *Crop Sci.* 37:1103-1109. 1997.
- BÄNZIGER, M.; EDMEADES, G.O. & LAFITTE, H.R. Selection for drought tolerance increases maize yields across a range of nitrogen levels. *Crop Sci.* 39:1035-1040. 1999.
- BÄNZIGER, M.; LAFITTE, H.R.; EDMEADES, G. Intergenotypic competition during evaluation of maize progenies under limited and adequate N supply. *Field Crop Research*, v.44, n.1, p-26-31, 1995.
- CARLONE, M. R. & RUSSEL, W.A. Response to plant densities and nitrogen levels for maize cultivars from different eras for breeding. *Crop Science*, Madison, v.27, p.465-70, 1987.
- COELHO, A .M.; FRANÇA, G.E.; BAHIA FILHO, A.F.C.; GUEDES, G.A.A. Doses e métodos de aplicação de fertilizantes nitrogenados na cultura do milho sob irrigação. *Rev. Bras. de Ci. Solo.* Campinas, v.16, p. 61-67. 1992.
- DURÃES, F.O.M.; PAIVA, E.; MAGALHÃES, P.C.; SANTOS, M.X.; PEREIRA, J.J.; LABORY, C.R.G. Critérios morfo-fisiológicos utilizados para seleção de genótipos de milho visando tolerância à seca . **In:** CONGRESSO BRASILEIRO DE FISIOLOGIA VEGETAL, 6, 1997, Belém, PA. Resumos. Belém: SBFV, p. 291.
- DURÃES, F.O.M.; GAMA, E.E.; MAGALHÃES, P.C.; MARRIEL, I.E.; CASELA, C.R.; OLIVEIRA, A.C.; LUCHIARI, J.R.; SHANAHAN, J.F. The usefulness of chlorophyll fluorescence in screening for water, N use efficiency, Al toxicity, and disease in maize. **In:** EASTERN AND SOUTHERN AFRICA MAIZE CONFERENCE. 7 SYMPOSIUM ON LOW NITROGEN AND DROUGHT TOLERANCE IN MAIZE. 2002. Nairobi. [abstracts and proceedings] Mexico CIMMYT. 2002.
- FERNÁNDEZ, J.E.; MURILLO, J. M.; MORENO, F.; CABRERA, F. Reducing fertilization for maize in southwest Spain. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v. 29 n. 19- 20, p. 2829-2840, 1998.
- LAFITTE, H.R.; EDMEADES, G.O . Improvement for tolerance to low soil nitrogen in tropical maize I. Selection criteria. *Field Crop Research*, v.39, n 1, p. 1-14, 1994 .
- LARCHER, W. *Ecofisiologia vegetal*. Rima Artes e Textos. São Carlos, SP. 2000. 531 p. (Tradução: Carlos Henrique B. A. Prado)
- LICHTENTHALER, H.K. *Chlorophyll and Carotenoids: Pigments of photosynthetic Biomembranes*. Methods in Enzymology. Vol 148, 1987.
- MARSCHNER, H. *Mineral nutrition of higher plants*. London: Academic Press. 1995, 889p.
- MEDICI, L.O. *Cruzamentos dialélicos entre linhas de milho contrastantes no uso de Nitrogênio*. USP/ESALQ-Tese de Doutorado. Piracicaba, 2003.
- MOLL, R.H.; KRAMPRATH, E.T.; JACKSON, W.A. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. *Agronomy Journal*, v. 74, n 3, p. 562-564. 1982.
- PORRA, R.J.; THOMPSON, W.A.; KRIEDMANN, P.E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et biophysica Acta*, 975 (1989), p.384-394.
- ROSIELLE, A.A .; HAMBLIN, J. Theoretical aspects of selection for yield in stress and non-stress environments. *Crop Science*, v.21, n.1, p. 943-946, 1981.

SILVA, Fábio César da. *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. 1ª ed. Brasília: EMBRAPA SOLOS, EMBRAPA INFORMÁTICA AGROPECUÁRIA, 1999. 370p.

ZAGATTO, E.A.G.; JACINTHO, A.O.; REIS, B.F.; KRUG, F.J.; BERGAMIN F^o., H.; PESSEDA, L.C.R.; MORTATTI, J.; GINÉ, M.F. **Manual de análises de plantas e águas empregando sistemas de injeção em fluxo**. USP/CENA. Radioquímica e Química Analítica: Manual de Laboratório. Piracicaba, SP. 1981. 40 p.

Tabela 1. Variáveis descritoras de linhagens de milho cultivadas sob baixo nível de nitrogênio.

Valores	FF	ALP	ALE	PQ	IST	NESP	PRL	PG ₁₃	EVN	SPAD	ISN
Mínimo	62	103	33	0,0	0,5	7	0,3	94	1	22	49
Máximo	76	185	108	6,5	0,9	34	1,6	1462	4	45	100
Média	70	139	65	0,8	0,8	21	0,9	579	2,5	35	78
Desvio padrão	3	18	12	1,1	0,1	5	0,2	267	0,6	5	11

Legenda: FF, fitoresistência fenotípica; ALP, área de planta; ALE, área de espiga; PQ, planta quebrada; IST, índice de estiramento; NESP, quantidade de espigas na parcela; PRL, prolificidade; PG₁₃, peso de grãos (planta, a 13% umidade); EVN, escala visual de notas (1 a 5); SPAD, conteúdo de clorofila (leitura SPAD meter); ISN, índice de suficiência de nitrogênio (100 * média de leituras SPAD por genótipo / maior média de leituras SPAD referência)

Tabela 2. Correlação entre variáveis descritoras de linhagens de milho cultivadas sob baixo nível de nitrogênio.

Variáveis	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8
V1, EVN	1							
V2, SPADa	-0,86	1						
V3, SPADb	-0,86	0,79	1					
V4, [N]	-0,79	0,79	-	1				
V5, Cl _o Arnon	-0,52	0,42	-	-	1			
V6, Cl _o Lichenthaler	-0,54	0,21	-	-	0,82	1		
V7, Cl _o Parra	-0,35	0,36	-	-	0,91	0,87	1	
V8, PG _{13%}	-0,55	-	-	-	-	-	-	1

**, significância a 5% de probabilidade; - dados não apresentados.
 Legenda: EVN, escala visual de notas (1 a 5); SPADa, teor de clorofila (SPAD, na folha adjacente a espiga); SPADb, teor de clorofila (SPAD, na folha basal); [N], concentração de N na folha adjacente a espiga; Cl_o Arnon, teor de clorofila pelo método de Arnon (1949); Cl_o Lichenthaler, teor de clorofila pelo método de Lichenthaler (1987); Cl_o Parra, teor de clorofila pelo método de Parra (1989); PG_{13%}, produção de grãos a 13% de umidade

Fig. 1. Relação entre teor de clorofila (leitura SPAD meter), índice de suficiência de nitrogênio (ISN) e escala visual de notas (1 a 5). (Cada ponto representa a média de 30 leituras por genótipo de milho).

