

EFEITO DO GENÓTIPO DO MILHO NA ATIVIDADE DA NITROGENASE E DA NITRATO-REDUTASE¹

JOSÉ IVO BALDANI², ROBERTO ANTONIO GOIC BLAÑA³ e JOHANNA DÖBEREINER⁴

RESUMO - Em dois experimentos de campo, estudou-se o efeito do genótipo do milho na interação entre atividade da nitrogenase (N_2 -ase) nas raízes e da nitrato-redutase (NR) nas folhas. Confirmou-se maior nitrogenase na cultivar Piranão que na UR-I, mas um ciclo de seleção para alta fixação de N_2 não teve efeito. Linhagens da UR-I em S_2 selecionadas para alta e baixa fixação de N_2 por outro lado mostraram diferenças significativas. Em ambos os experimentos a atividade da nitrogenase nas raízes mostrou correlação altamente significativa ($P = 0,01$) e negativa com o NR nas folhas, mesmo quando a fonte de variação foi o genótipo. O "slope" da regressão, isto é, a proporção do aumento da N_2 -ase com decréscimo do NR variou com a idade da planta e com o nível de NO_3^- no solo. A produção de grãos na cultivar Piranão não foi maior que na UR-I. A aplicação de 40 kg N/ha aumentou a produção, mas dosagens maiores tiveram pouco efeito. Os resultados indicam que trabalhos de melhoramento de milho que focalizam aumentos da fixação de N_2 necessariamente deverão incluir estudos simultâneos da NR para que se possam obter genótipos que permitam complementação da fixação de N_2 com adubos nitrogenados.

Termos para indexação: milho, nitrogênio, fixação, nitrato-redutase, genótipo.

INTERACTIONS OF NITRATE-REDUCTASE AND NITROGENASE ACTIVITIES IN MAIZE GENOTYPES

ABSTRACTS - In two field experiments the effects of plant genotype on the interaction of nitrogenase activity (N_2 -ase) in roots and nitrate-reductase activity (NR) in leaves were studied. Higher nitrogenase activities in the cultivar Piranão than in UR-I were confirmed, but one cycle of massal selection for high N_2 -ase was not effective. Lines of UR-I in S_2 selection for high and low N_2 -ase, on the other hand, showed significant differences. In both experiments N_2 -ase activity in roots showed negative correlations with NR in leaves, even when plant genotype was the only source of variance. The slope of these regressions, that is, the proportion of increase of N_2 -ase with decreasing NR varied with age of the plant and nitrogen level in soil. The grain yield of both cultivars did not differ significantly. Nitrogen applications were significant only at the 40 kg/ha level. The results of the paper indicate that maize breeding for increased nitrogen fixation should include studies on the interactions of nitrate assimilation to permit selection of maize genotypes which permit complementation of nitrogen fixation with nitrogen fertilizers.

Index terms: maize, nitrogen, fixation, nitrate reductase, genotype.

INTRODUÇÃO

A necessidade de aumentar a produção de cereais, para suprir a falta dos produtos no mercado mundial, induziu agricultores a usar indiscriminadamente fertilizantes nitrogenados minerais para obtenção de maior produtividade.

Fertilizantes nas formas amoniacais e nítricas são os mais aplicados, principalmente em cereais, como milho (*Zea mays* L.). Entretanto, mesmo que o milho possa, potencialmente, usar todo o nitrogênio aplicado no solo, a aplicação de altas

doses ocasionará perdas consideráveis, durante o ciclo da cultura, e a eficiência de seu aproveitamento é apenas em torno de 40% (Delwiche 1977).

A fixação biológica de N_2 , em plantas de milho, ocorre através de associação de bactérias fixadoras de N_2 com as raízes da planta, notadamente por *Azospirillum* spp. (Büllow et al. 1975, Büllow & Döbereiner 1975, Silva & Döbereiner 1978, Hegazi & Vlassak 1977, Pereira et al. 1978, Magalhães et al. 1979). Estudos recentes (Baldani & Döbereiner 1979) mostram ainda especificidade hospedeira em milho, trigo e arroz, confirmando a importância de *Azospirillum* spp. na fixação biológica de N_2 em cereais e estreitas interrelações bactéria/planta. Ao contrário do trigo e arroz, que são infectados pelo grupo *A. brasiliense* n^o, as raízes do milho parecem ser preferencialmente infectadas por *A. lipoferum* (Baldani & Döbereiner 1979).

O método indireto de avaliação da fixação de

¹ Aceito para publicação em 15 de maio de 1979.

² Eng^o Agr^o, Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos (SNLCS) - EMBRAPA, Rua Jardim Botânico, 1.024 - ZC 20, CEP 20.000 - Rio de Janeiro, RJ.

³ Bolsista do Programa Fixação Biológica de Nitrogênio-Convênio EMBRAPA, CNPq.

⁴ Eng^o Agr^o, Ph.D., SNLCS - EMBRAPA.

nitrogênio pela redução de acetileno (Dillworth 1966) tem sido usado como medida comparativa em raízes extraídas do solo (Döbereiner 1978). Infelizmente, não há, ainda, método melhor de análise quantitativa. Atividades da N_2 -ase, variando desde 100 a 7.124 nmoles $C_2H_4/h/g$ raiz, após a pré-incubação de 16 a 18 horas, foram obtidas em variedades e linhagens de milho cultivados no campo (Barber et al. 1978, Büllow & Döbereiner 1975, Büllow et al. 1976). Esses dados evidenciam a capacidade que possuem, certos genótipos, na fixação de N_2 , apesar das limitações que o método empregado apresenta.

Linhagens de milho, selecionadas para alta atividade de N_2 -ase, apresentaram significativa interação com vários níveis de fertilizantes nitrogenados (Büllow 1978). Döbereiner (1978) realça que estudos da interação entre fertilizantes minerais nitrogenados, com a atividade da N_2 -ase, são, agronomicamente, importantes. Mesmo pequenas contribuições da fixação biológica de N_2 tornam-se relevantes quando complementadas com fertilizantes nitrogenados. Neyra et al. (1976), trabalhando com os parâmetros da NR e N_2 -ase, evidenciam a possibilidade de interação dessas duas enzimas na incorporação de nitrogênio às plantas, pela flutuação da atividade da NR e N_2 -ase durante o ciclo da cultura, e Pereira et al. (1978) observaram que o milho pode beneficiar-se, simultaneamente, da fixação biológica de N_2 e da assimilação de NO_3^- com baixos níveis de N no solo.

Estudos objetivando selecionar plantas para uma melhor utilização de nitrogênio, seja pela fixação biológica, seja pela assimilação de N mineral, baseados na existência de diferenças genotípicas, mostraram resultados promissores (Büllow & Döbereiner 1975, Beauchamp et al. 1976, Boyat & Robin 1977, Büllow 1978).

O presente trabalho apresenta resultados de dois experimentos que apóiam e ampliam aqueles sobre as interações das enzimas nitrogenase e nitrato-redutase em diferentes genótipos, durante diferentes estágios fisiológicos do milho.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimento 1

Cultivares de milho braquítico Cv. Piranão e UR-I, originais (Co) e selecionadas para alta ativi-

dade N_2 -ase após o primeiro ciclo de seleção (C_1), foram plantadas no verão 76/77 em planossolo da série Agrostologia, no campo experimental da UFRRJ. A adubação básica consistiu de 37 kg P/ha como superfosfato simples, 25 kg K/ha, como cloreto de potássio, e 1 t/ha de calcário dolomítico. Os níveis de Nitrogênio (0, 40, 80, 120 kg/ha) foram aplicados na forma de $(NH_4)_2SO_4$, parcelados, e nas seguintes épocas:

1. Nível 0 - Testemunha.
2. Nível 40 - 20 kg no plantio + 20 kg aos 40 dias.
3. Nível 80 - 20 kg no plantio + 20 kg aos 20 dias + 20 kg aos 40 dias + 20 kg aos 60 dias.
4. Nível 120 - 40 kg no plantio + 80 kg aos 40 dias.

O esquema experimental foi um fatorial 4×4 , com cinco repetições, dispostas em blocos ao acaso; as parcelas tinham $17,28 m^2$, com quatro fileiras/parcela, sendo que para determinação da nitrato-redutase, utilizaram-se apenas três repetições.

Nas épocas de floração e enchimento dos grãos, foram selecionadas duas plantas representativas e em estágio fisiológico semelhante, de cada parcela. Retiraram-se as duas primeiras folhas completamente expandidas, por planta, que foram colocadas em gelo, para determinação de nitrato-redutase, no laboratório. A nitrato-redutase foi determinada pelo método *in vitro* (Klepper et al. 1971, Neyra & Hageman 1974). Rodelas de 0,5 cm de diâmetro das folhas foram pesadas (200 mg) e colocadas em 5 ml de meio de incubação contendo: K_2HPO_4 0,1 M (pH 7,5), NO_3^- 0,1 M, 0,05% Neutronix, 1% propanol. O meio com as folhas foi incubado a $30^\circ C$, durante uma hora, em câmara escura. Determinou-se a atividade de NR pela quantidade de NO_2^- presente em alíquotas de 0,2 ml, tomadas no tempo zero e no final de incubação, quando colocadas em 2 ml da solução de 1:1 (v/v) de 0,02% N-1 naftiletieno-diamina e 1% sulfanilamida em 1,5 M HCl. Completou-se o volume para 4 ml com água destilada, e, após quinze minutos, determinou-se a absorvência a 540 nm.

Raízes dessas mesmas plantas (aproximadamente 0,5 g peso seco) e das duas repetições adicionais foram extraídas e colocadas em recipientes (300 ml) contendo água deionizada, e transportadas para o laboratório para determinação da ativi-

dade da N_2 -ase. A água foi substituída por nitrogênio em estado gasoso, e os vidros foram fechados hermeticamente, adicionando-se 2% (v/v) de O_2 . As raízes foram pré-incubadas por um período de 16 horas, a $30^\circ C$, antes da injeção de acetileno (C_2H_2) para determinação da atividade da nitrogenase.

Após a pré-incubação, injetou-se 10% (v/v) C_2H_2 , deixando as raízes expostas ao gás por duas horas, a $30^\circ C$. Em seguida, determinou-se a atividade da nitrogenase, quantificando, por cromatografia gasosa, o C_2H_4 formado pela redução de C_2H_2 . Foi utilizado um cromatógrafo de gás (Perkin Elmer F-11), equipado com coluna de Poropak N, de 2 m x 3 m, a $110^\circ C$.

A atividade da N_2 -ase foi correlacionada com a atividade da NR durante as fases de floração e enchimento dos grãos.

Experimento 2

Linhagens de milho em S_2 , originárias da cultivar UR-I, selecionadas para alta e baixa atividade nitrogenase, foram plantadas no verão 77/78, em solo podzólico vermelho-amarelo, da série Itaguaí, no campo experimental da EMBRAPA. A adubação básica consistiu de 37 kg P/ha como superfosfato simples, 25 kg K/ha como cloreto de potássio, e 1 t/ha de calcário dolomítico.

Foram utilizadas doze linhagens de milho - sendo que seis delas provinham de seleção para alta atividade da nitrogenase, e as outras seis, de seleção para baixa atividade da nitrogenase -, e dois níveis de nitrogênio (20 e 80 kg N/ha). O esquema experimental foi o de blocos ao acaso, com duas repetições. As parcelas eram formadas por uma única fileira para cada linhagem. Fez-se o parcelamento do nitrogênio, aplicando-se 20 kg no plantio (em todos os tratamentos) e 20 kg N/ha na semana anterior a cada coleta, na forma de nitrocálcio.

A metodologia aplicada para determinação da nitrogenase e nitrato-redutase foi a mesma utilizada no experimento anterior, variando somente as épocas das coletas: estágio vegetativo (40 dias), emissão do pendão floral (60 dias), embonecamento (70 dias).

A atividade da N_2 -ase e NR foi correlacionada nas épocas de emissão do pendão floral e do embonecamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro experimento, foram observadas duas cultivares com uma seleção massal feita para alta fixação de N_2 , com quatro níveis de N mineral. Os resultados apresentados na Fig. 1 confirmam maior atividade de nitrogenase na cultivar Piranão, especialmente durante o enchimento dos grãos.

Uma só seleção (ciclo 1), entretanto, não parece ter sido suficiente para modificar a atividade da nitrogenase. Durante a época da floração, a aplicação de 40 kg de N já reduziu a atividade da nitrogenase, e a de 80 kg impediu-a quase que completamente. Devido à aplicação parcelada dos níveis de N, não é provável que tenha havido lixiviação considerável deste adubo. Mesmo assim, a atividade da nitrogenase durante a época do enchimento dos grãos, época mais importante no que se refere à necessidade de N, a fixação de N_2 não foi reduzida mesmo com 80 kg de N, principalmente na cultivar Piranão, que, em todos os níveis de N, mostrou maior atividade de N_2 -ase que a cultivar UR-I. Independentemente dos níveis de N aplicado, a N_2 -ase, no enchimento dos grãos, foi mais alta que na floração, e a atividade da nitrato-redutase foi mais baixa (Fig. 2 e Tabela 1). Como era de esperar, a adubação nitrogenada aumentou a atividade da nitrato-redutase *in vitro*, isto é, potencial, indicando que o sistema enzimático NR ajustou-se ao maior fornecimento de N. Entretanto, não mostrou as diferenças observadas entre cultivares na atividade da N_2 -ase. A interação entre estas duas enzimas pode ser melhor observada na regressão apresentada na Fig. 3. Em ambas as épocas foram obtidas regressões altamente significativas e negativas, mas a diminuição da NR-enzima responsável pela assimilação do N nítrico do solo - foi menor com aumento da nitrogenase, indicando que é possível manter níveis razoáveis de NR, que atuam simultaneamente com a N_2 -ase, principalmente durante o enchimento dos grãos. Nesta época, um aumento de seis vezes da atividade da N_2 -ase corresponde a uma perda de apenas metade da atividade do NR; já durante a floração o efeito na NR, foi quatro vezes maior, e, nesta época, a complementação das duas fontes de N mineral e biológico parece mais difícil.

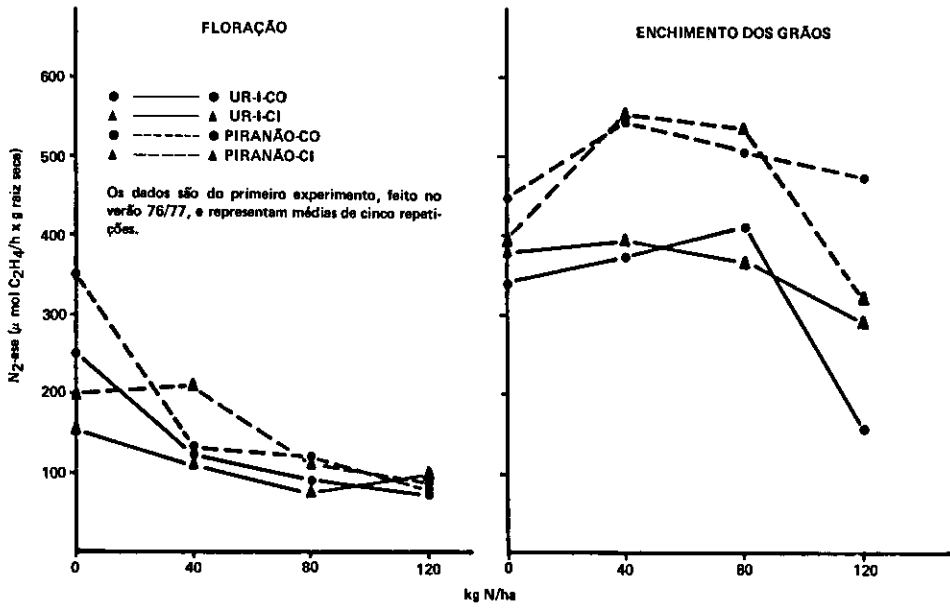


FIG. 1. Efeito de níveis de adubação nitrogenada na atividade da nitrogenase de duas cultivares de milho (UR-I e Piranão) e dois ciclos de seleção massal para alta atividade de $N_2\text{-ase}$ (C₀ e C₁).

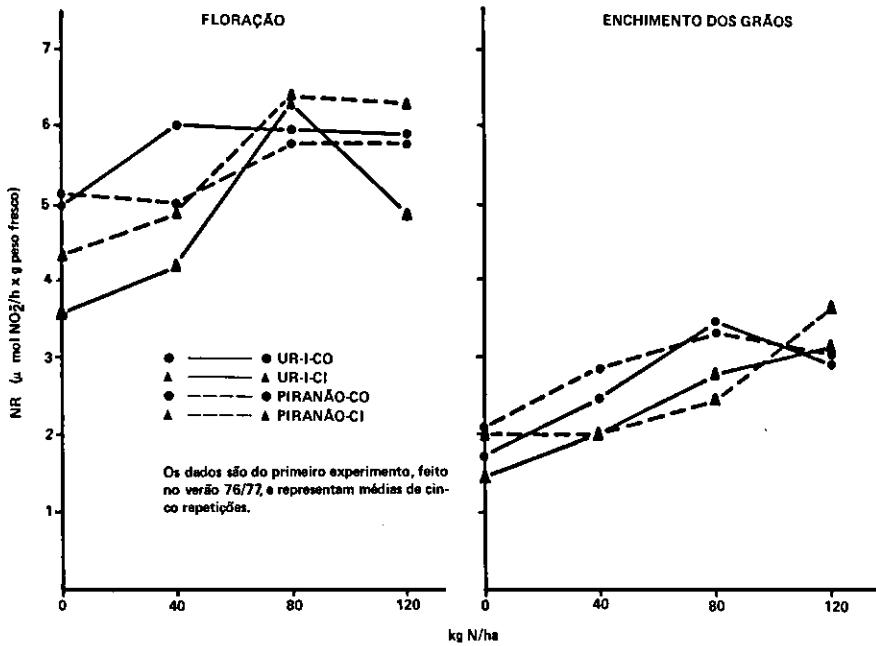


FIG. 2. Efeito de níveis de adubação nitrogenada na atividade da nitrato-reductase de duas cultivares de milho (UR-I e Piranão) e dois ciclos de seleção massal para alta atividade de $N_2\text{-ase}$ (C₀ e C₁).

TABELA 1. Análise de variância dos dados apresentados nas Fig. 1 e 2*

Valores de F	Nitrogenase		Nitrato-redutase	
	Floração	Enchimento grãos	Floração	Enchimento grãos
Cultivares	0,486	2,78 *	1,14	0,65
Níveis de N	3,33 *	2,25	3,26 *	6,08 **
Cultivares x N (veis de N	0,44	0,32	0,43	0,50
D.M.S. (5%) Cultivares	-	134,50	-	-
D.M.S. (5%) Níveis de N	105,2	-	1,13	0,74
C.V. (%)	117,3	52,6	25,5	34,0

* Devido à grande variação na primeira colheita, a análise foi efetuada separadamente para as duas épocas.

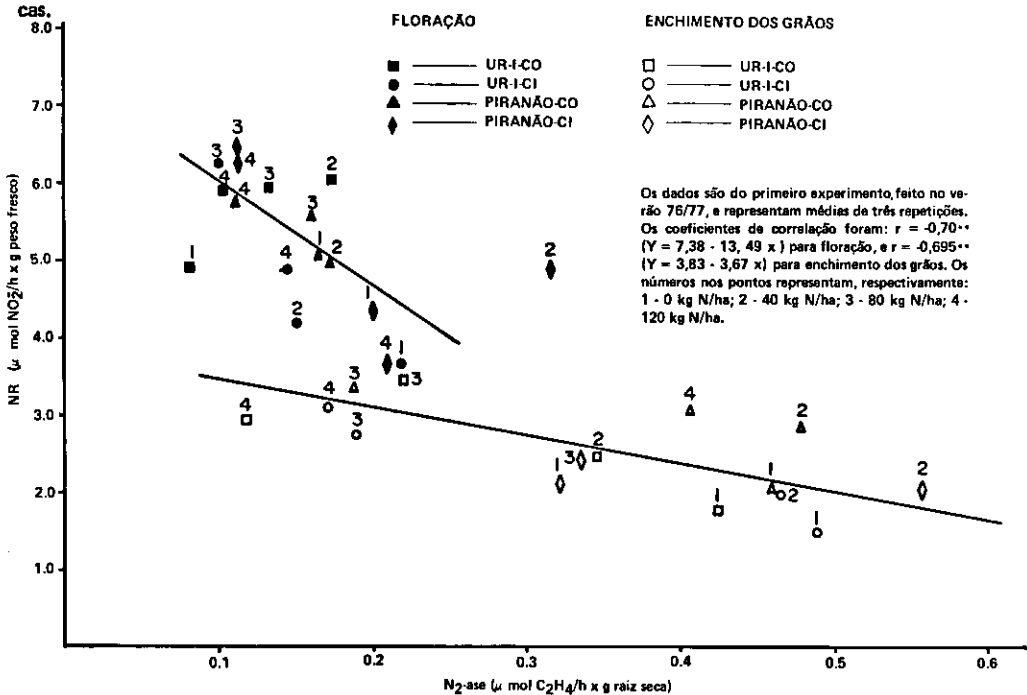


FIG. 3. Correlação das atividades da nitrogenase nas raízes e nitrato-redutase nas folhas em duas cultivares de milho (UR-I e Piraná) e dois ciclos de seleção massal para alta atividade de N₂-ase (C₀ e C₁).

Os resultados apresentados na Fig. 4 não mostraram diferença entre cultivares na produção de grãos, mas houve diferenças significativas para níveis de adubos nitrogenados (Tabela 2). Na cultivar Piraná, a aplicação de 40 kg N/ha deu uma produção equivalente à de 80 e 120 kg N/ha, enquanto na cultivar UR-I (Co), o melhor nível foi o de 80 kg N/ha. Já a aplicação de 120 kg N/ha, diminui a produção da cultivar Piraná para um ciclo de seleção.

No segundo experimento, tentou-se isolar o efeito do nitrogênio mineral e observar melhor o efeito do genótipo do milho. Em vez de seleção, foram usadas linhagens em S₂, selecionadas para alta e baixa atividade da nitrogenase, que foram comparadas em apenas dois níveis de N. Na Fig. 5, observa-se novamente confirmado o efeito do genótipo do milho na atividade da nitrogenase e NR. O efeito na N₂-ase é muito maior que as diferenças na NR. Infelizmente, devido à condição

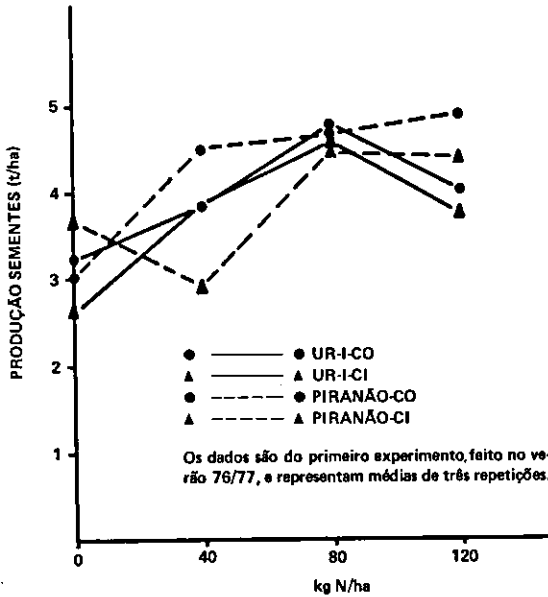


FIG. 4. Efeito de níveis de adubos nitrogenados na produção de sementes (t/ha) de duas cultivares de milho (UR-I e Piranão) em dois ciclos de seleção massal para alta atividade de N_2 -ase (C_0 e C_1).

TABELA 2. Análise de variância dos dados apresentados na Fig. 4.

Valores de F	Produção sementes
Cultivares	0,61
Níveis de N	4,64*
Cultivares x Níveis de N	0,60
D.M.S. (5%) Níveis de N	0,87
C.V. (%)	26,30

*Significativo ao nível de 5%.

climática, não foi possível fazer observação durante o período do enchimento dos grãos, época esta considerada mais importante no primeiro experimento. Mas, neste experimento, o efeito do N foi relativamente menor que o do genótipo, visto que a NR dobrou, com a aplicação de N mineral. Isto indica novas possibilidades de trabalhos fitotécnicos que visem a complementar as duas atividades. Para estudos específicos do efeito do genótipo, a correlação entre NR e N_2 -ase foi calculado separadamente, para as parcelas, com e sem N mineral (Fig. 6). Nas parcelas adubadas, obteve-se uma regressão significativa e negativa, confirmando a interdependência da atividade dessas duas enzi-

mas, mesmo isolado o efeito da adubação nitrogenada. Na ausência de adubação nitrogenada, entretanto, não houve correlação entre as duas enzimas (Fig. 6).

Tendo sido demonstrado que o *Azospirillum* possui uma nitrato-redutase muito ativa (Neyra & Berkum 1977), pode-se pensar na possibilidade de redução de nitrato nas raízes de milho, nos genótipos mais favoráveis à fixação de N_2 , pela facilidade de infestação com *Azospirillum*. Se há redução de nitrato nas raízes mais infectadas, a NR nas folhas ficará reduzida, sem prejuízo para a assimilação de NO_3 . Uma outra possibilidade seria a maior ou menor capacidade de extrair N do solo, sendo que os genótipos capazes de maior assimilação de N fixariam menos N_2 , devido às altas concentrações de NO_3 na raiz.

Os resultados apresentados reforçam ainda mais as observações de Büllow & Döbereiner (1975) e Büllow (1978) quanto à capacidade que possuem certos genótipos de milho, de serem mais eficientes na fixação de N_2 . Resultados obtidos com trigo, arroz e *Paspalum*, mostraram, também, a grande variação entre genótipos (Döbereiner 1970, Rinaudo et al. 1975, Nery 1977), apoiando ainda mais a idéia de que a exploração do potencial dessas plantas poderá ser de grande importância para a agricultura mundial. Por outro lado, a NR foi sugerida como um critério bioquímico para a seleção de genótipos de plantas (Hageman et al. 1967), tendo sido mostradas diferenças significativas entre diferentes genótipos de milho, sorgo e trigo (Eck & Hageman 1974, Brunetti & Hageman 1976, Boyat & Robin 1977, Pal et al. 1976).

Assim sendo, os resultados apresentados sugerem que trabalhos de melhoramento de milho voltados para a fixação de N_2 devem incluir estudos simultâneos da NR, para que se possam obter genótipos que permitam a complementação da fixação de N_2 com adubos nitrogenados. Essa seleção de genótipos de milho, baseada na eficiência da N_2 -ase e NR, é um aspecto importante, visto que as condições tropicais favorecem bastante o metabolismo fotossintético dessas enzimas. Porém, a exploração do potencial dessas plantas dependerá de melhor conhecimento de certos caracteres fisiológicos que podem interferir na obtenção de resultados positivos relacionados à produção.

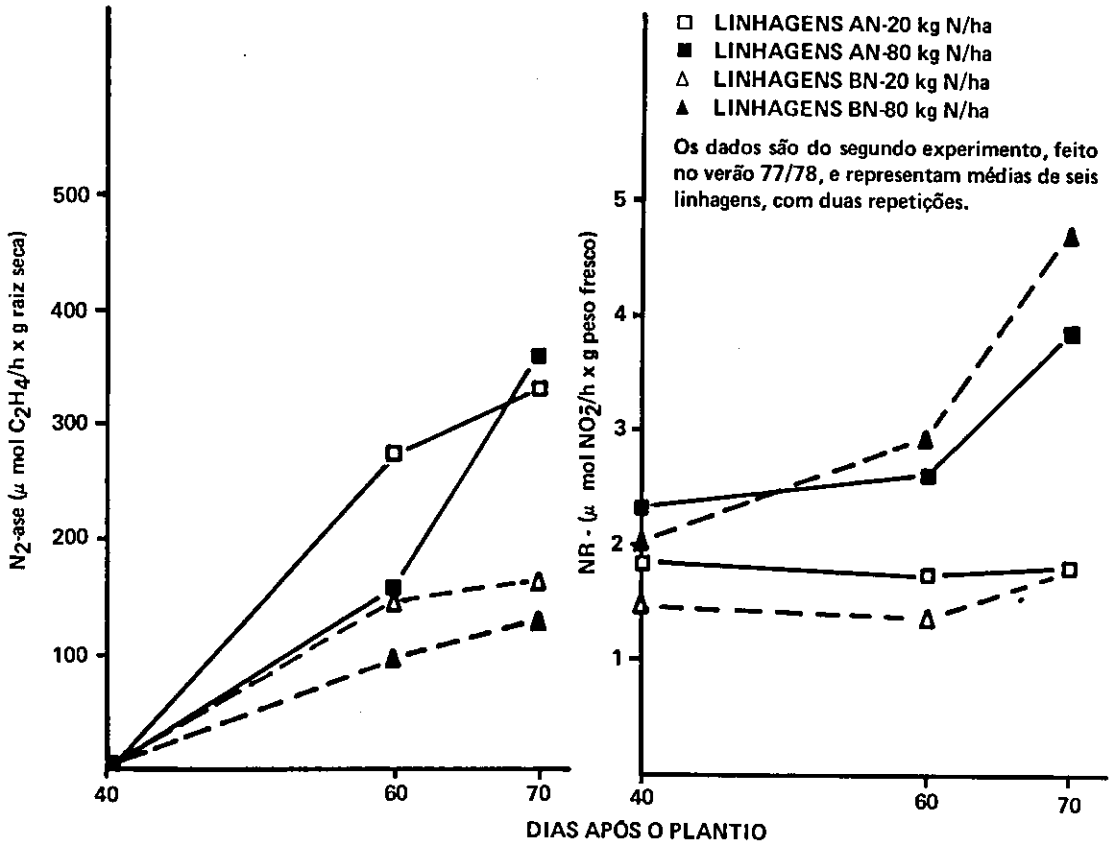


FIG. 5. Efeitos de dois níveis de adubos nitrogenados na atividade da nitrogenase e nitrato-redutase em linhagens da cultivar UR-1 em S_2 , selecionadas para alta e baixa atividade de nitrogenase.

TABELA 3. Análise de variância dos dados apresentados na Fig. 5.

Valores de F	Nitrogenase *	Nitrato-redutase
Linhagens	5,92 **	4,41 **
Níveis de N	3,25	183,02 **
Época	10,21 **	43,89 **
Linhagens x Níveis de N	0,62	1,75
Linhagem x Época	3,21 **	1,31
Níveis de N x Época	2,67	31,83 **
Linhagem x Níveis de N x Época	0,69	0,43
D.M.S. (5%) Linhagens	117,4	0,513
D.M.S. (5%) Níveis de N	-	0,209
D.M.S. (5%) Época	47,9	0,256
D.M.S. (5%) Linhagem x Época	166,1	-
D.M.S. (5%) Níveis de N x Época	-	0,362
C.V. (%)	55,9	26,4

* Valores de F, calculados somente com dados das épocas de pendão floral (60 dias) e embonecamento (70 dias).

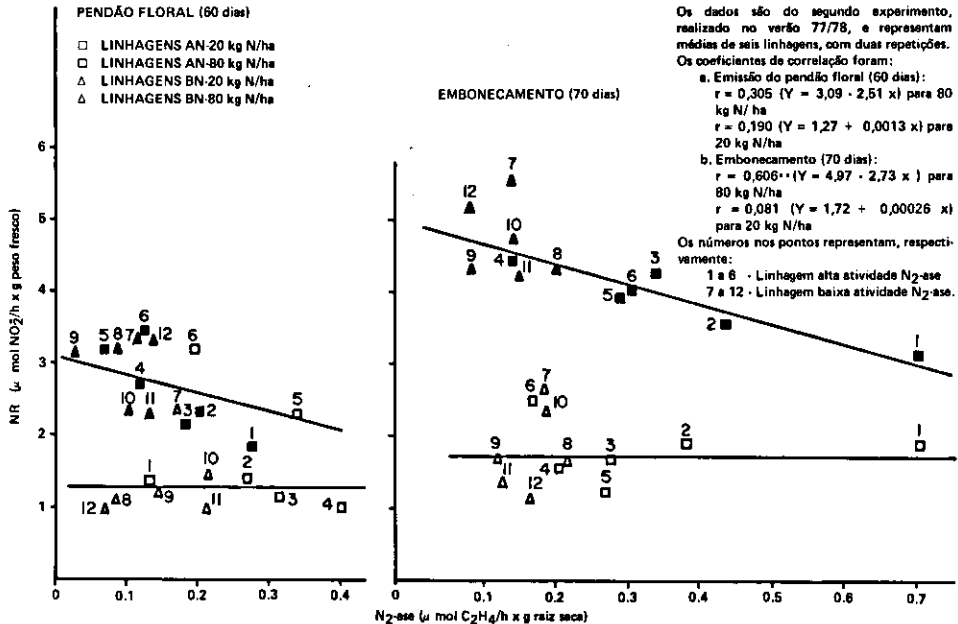


FIG. 6. Correlação das atividades da nitrogenase nas raízes e nitrato-reductase nas folhas, em linhagens da cultivar UR-I em S_2 , selecionadas para alta e baixa atividade de nitrogenase.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Joaquim F.W. von Büllow, pelo fornecimento de material genético, sem o qual este trabalho não teria sido possível.

REFERÊNCIAS

- BALDANI, V.L.D. & DOBEREINER, J. Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. Soil Biol. Biochem., 1977. Prelo.
- BARBER, L.E.; TJEKEMA, J.D. & EVANS, H.J. Acetylene reduction in the root environment of some grasses and the other plants in Oregon. In: Environmental Role of Nitrogen Fixing Blue-green Algae and Asymbiotic Bacteria. Granhall, Uppsala, 1978. p. 366-72.
- BEAUCHAMP, E.G.; KANNEMBERG, L.W. & HUNTER, R.B. Nitrogen accumulation and translocation in corn genotypes following silking. Agron. J., 68:418-22, 1976.
- BOYAT, A. & ROBIN, P. Relations entre productivité, qualité du grain et activité nitrato-réductase chez les céréales Ann. Améliar. Plantes, 27:389-410, 1977.
- BRUNETTI, N. & HAGEMAN, R.H. Comparison of *in vivo* and *in vitro* assays of nitrate-reductase in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. Plant Physiol. 58: 583-7, 1976.
- BÜLLOW, J.F.W. von. Plant influence in symbiotic nitrogen fixation. In: DOBEREINER, J., ed. Limitations and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics. New York, Plenum Press, 1978. p. 75-94. Basic Life Sciences.

_____. & DOBEREINER, J. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 72:2389-93, 1975.

_____. & MARRIEL, I.E.; NERY, M.; NEVES, M. C.P.; PERES, J.R.R. & DOBEREINER, J. Potencial de fixação de nitrogênio molecular em genótipos de milho (*Zea mays* L.). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 28., Belo Horizonte, 1975.

_____. PODESTA-FILHO, J.A. & DOBEREINER, J. A atividade de nitrogenase em raízes de milho em cruzamentos dialélicos de variedades. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE MILHO E SORGO, 9., Piracicaba, SP, 1976.

DELWICHE, C.C. Energy relations in the global nitrogen cycle. Ambio, 6:106-11, 1977.

DILLWORTH, M.J. Acetylene reduction by nitrogen fixing preparations from *Clostridium pasteurianum* Biochem. Biophys. Acta, 127:285-94, 1966.

DOBEREINER, J. Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the rhizosphere of *Paspalum notatum*. Flugge. Centralbl. Bact. Parasitenkunde II, 124:224-30, 1970.

_____. Nitrogen fixation in grass-bacteria associations in the tropics. In: ISOTOPES in biological dinitrogen fixation. Vienna IAEA, 1978. p. 51-69.

ECK, H.V. & HAGEMAN, R.H. Nitrate-reductase activity in sudangrass cultivars. Crop Sci., 14(2):283-7, 1974.

HAGEMAN, R.H.; LENG, E.R. & DUDLEY, J.W. A biochemical approach to plant breeding. Adv. Agron., 19:45-86, 1967.

HEGAZI, N. & VLASSAK, K. Microscopic observations on the nitrogen fixing *Spirillum* occurring in the rhizosphere of maize and sugar cane. In: EUROPEAN

- SEMINAR ON BIOLOGICAL SOLAR ENERGY CONVERSION SYSTEMS, 1972. Grenoble Austrans, 1977.
- KLEPPER, L.; FLESCHER, D. & HAGEMAN, R.H. Generation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide for nitrate reduction in green leaves, *Plant Physiol.*, 48:580-90, 1971.
- MAGALHÃES, F.M.M.; PATRIQUIN, D. & DÖBEREINER, J. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. *R. Bras. Biol.* 1979. Prelo.
- NERY, M.; ABRANTES, G.T.V.; SANTOS, D. dos & DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em trigo. *R. Bras. Ci. Solo*, 1:15-20, 1977.
- NEYRA, C.A. & BERKUM, P. van. Nitrate reduction and nitrogenase activity in *Spirillum lipoferum*. *Can J. Microbiol.*, 23:306-10, 1977.
- _____. & HAGEMAN, R.H. Dependence of nitrate reduction on electron transport in chloroplasts. *Plant. Physiol.*, 54:480-3, 1974.
- _____.; PEREIRA, P.A.A.; BÜLLOW, J.F.W. von. & DÖBEREINER, J. Efeito de N e Mo na atividade da nitrogenase e nitrato reductase em milho braquiúfico. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE MILHO E SORGO, 9., Piracicaba, 1976.
- PAL, U.R.; JOHNSON, R.R. & HAGEMAN, R.H. Nitrate reductase activity in heat (drought) tolerant and intolerant maize genotypes. *Crop Sci.*, 16:775-9, 1976.
- PEREIRA, P.A.A.; BÜLLOW, J.F.W. von & NEYRA, C.A. Atividade da nitrogenase, nitrato-reductase e acumulação de nitrogênio em milho braquiúfico *Zea mays* L. (cv. Piranão) em dois níveis de adubação nitrogenada. *R. Bras. Ci. Solo*, 2:28-33, 1978.
- RINAUDO, G.; HADAD-FARES, I. & DOMMERGUES, Y.R. N₂-fixation in the rice rhizosphere: Methods of measurement practices suggested to enhance the process. In: AYANABA & DART., ed. *Biological nitrogen fixation in farming systems of the tropics*. New York, John Wiley, 1975. p. 313-22.
- SILVA, M.F.S. da & DÖBEREINER, J. Occurrence of *Azospirillum* spp. in soil and roots. In: DÖBEREINER, J. ed. *Limitations and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics*. New York, Plenum Press, 1978. p. 372. *Basic Life Sciences*.