

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE MILHO EFICIENTES
NA INTERAÇÃO COM *Azospirillum brasiliense***

FELIPE CECCON

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2019**

SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE MILHO EFICIENTES

NA INTERAÇÃO COM *Azospirillum brasiliense*

FELIPE CECCON
Engenheiro agrônomo

Orientador: PROF. DR. MANOEL CARLOS GONÇALVES

Co-orientadora: PROF^a. DR^a. LIVIA MARIA CHAMMA DAVIDE

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Dourados
Mato Grosso do Sul
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

Ceccon, Felipe

Seleção de genótipos de milho eficientes na interação com
Azospirillum brasiliense/ Felipe Ceccon - Dourados: UFGD, 2019. 82f

Orientador: Manoel Carlos Gonçalves

Co-orientadora: Livia Maria Chamma Davide

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências
Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Bactérias diazotróficas
2. Fixação de nitrogênio.
3. Melhoramento vegetal.
4. *Zea mays* L.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a)
autor(a).

**©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a
fonte.**

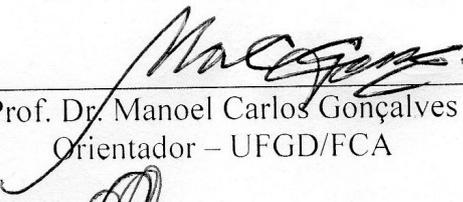
SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE MILHO EFICIENTES NA INTERAÇÃO COM *Azospirillum brasiliense*

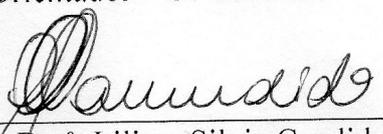
por

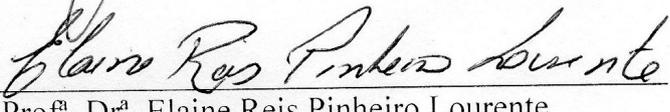
Felipe Ceccon

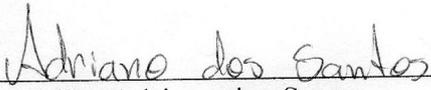
Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de
Mestre em Agronomia

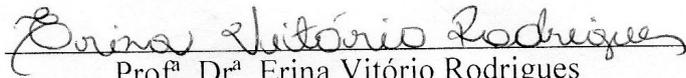
Aprovada em: 28/05/2019.


Prof. Dr. Manoel Carlos Gonçalves
Orientador – UFGD/FCA


Prof.^a. Dra.^a. Liliam Silvia Candido
UFGD/FCBA


Prof.^a. Dr.^a. Elaine Reis Pinheiro Lourente
UFGD/FCA


Dr. Adriano dos Santos
Consultor Embrapa Agroenergia


Prof.^a. Dr.^a. Erina Vitório Rodrigues
UnB

DEDICO

As energias universais que regem as forças naturais no planeta em que habitamos.

A memória de meu avô, Tranquilo Ferdinando Ceccon, e aos meus avós Maria Provensi Ceccon, Janete Braccini Damian e Sadi da Silva Damian.

Aos meus pais Gessi Ceccon e Simone Ceccon.

Aos meus irmãos, de sangue ou vida, Fernando Ceccon, Marcos Vinicius Capistrano Nichimura e José Henrique Bassani Linck.

A minha irmã Manuela Nunes Ceccon.

A todos de bem que buscam por meio do estudo encontrar uma maneira mais digna e justa de se viver.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela energia de cada manhã que me convencia a fazer o meu papel e influenciar os que em mim confiavam.

Agradeço a meu pai Gessi Ceccon e minha mãe Simone Ceccon por todo o recurso que se esforçaram pra me dar de maneira justa. Por toda confiança depositada em mim e pelo exemplo de seres humanos que são. Um mais expressivo e outro menos, obrigado por juntos terem me dado educação e discernimento para ser um homem de bem.

Agradeço a meus orientadores, o prof^o. Dr. Manoel Carlos Gonçalves e a prof^a Dr^a. Livia Maria Chamma Davide, pelos conselhos, ensinamentos, críticas construtivas, opiniões e principalmente pela paciência e confiança.

Ao meu colega de graduação, Franscesco Nathan da Fonseca Caneppele, quem disponibilizou a área para experimentação em sua propriedade, o Sítio São José, no município de Caarapó.

Aos colegas de pós-graduação: Dr^a. Euriann Yamamoto, Mse. Priscila Carvalho e Mse. Nahara Gabriela Piñeyro. Quem esteve me ajudando nos entraves de maior dificuldade para elaboração desse trabalho.

Aos meus colegas do Grupo de Melhoramento e Biotecnologia e Vegetal (GMBV): Beatriz Teixeira, Gabriele Bezerra, Leandro Da Rosa Escobar, Gabriela Amorin, Leonardo Assis, Isabela Neves, José Leonardo, Clovís Zanuni filho, Rogério Catarino Lima da Costa, Ronaldo Freire Ribeiro, Luiz Lima, Joyce Castro Xavier, Clodomiro Nicacio do Nascimento Junior, Leiziany Barcelos e Viviani Aparecida dos Santos Bernardo. Quem estiveram diretamente com trabalhadores de campo, professores e cientistas me auxiliando na condução desse trabalho.

Ao Dr. Adriano dos Santos, que mesmo não estando mais na UFGD, será um eterno membro do GMBV por dedicar-se para nos ajudar. Adriano, esse trabalho não teria sido o mesmo sem seu apoio. Muito obrigado.

A UFGD e aos demais profissionais com quem precisei trabalhar direta ou indiretamente para concluir esse trabalho. Técnicos de laboratórios, funcionários da fazenda, motoristas, faxineiras, jardineiros e guardas de segurança.

A CAPES por ter permitido que esse estudo fosse possível por meio de bolsa de estudos e auxílio financeiro com matérias de consumo.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS.....	XV
LISTA DE TABELAS.....	XVI
LISTA DE FIGURAS.....	XVII
RESUMO GERAL.....	XVIII
GENERAL ABSTRACT.....	XIX
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Aspectos gerais da cultura do milho.....	3
2.2 Nitrogênio.....	4
2.3 Efeitos da inoculação com <i>Azospirillum</i>	6
2.4 Melhoramento para eficiência no uso de <i>Azospirillum</i>	8
2.5 Distância genética e GGE Biplot na seleção de genótipos de milho.....	10
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13
CAPÍTULO I.....	20
RESUMO.....	20
ABSTRACT.....	21
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
2.1 Condições experimentais e caracterização dos genótipos.....	24
2.2 Tratamentos e características avaliadas.....	26
2.3 Análises estatísticas.....	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4. CONCLUSÕES.....	41
5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	42
CAPÍTULO 2.....	47
RESUMO.....	47
ABSTRACT.....	48
1. INTRODUÇÃO.....	49
2. MATERIAL E METODOS.....	51
2.1 Condições experimentais e caracterização dos genótipos.....	51
2.2 Tratamentos e variáveis avaliadas.....	53
2.3 Análises estatísticas.....	54
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	57
4. CONCLUSÕES.....	66
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
CONCLUSÃO GERAL.....	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Atributos químicos e teor de argila de amostras de solo das profundidades de 0-20 e 20-40 cm nos nas áreas experimentais em Dourados e Caarapó.....	25
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise da variância dos efeitos de 256 genótipos de milho sob dois níveis de inoculação com bactérias da espécie <i>Azospirillum brasiliense</i> em Dourados e Caarapó, na segunda safra de 2018.....	33
Tabela 2. Médias de sete variáveis avaliadas em 256 genótipos de milho, em Dourados e Caarapó, na presença (Com Ab) e ausência (Sem Ab) de inoculação de <i>A. brasiliense</i>	40
Tabela 3. Teor de nitrogênio médio avaliado em grãos de 20 genótipos que aumentaram e diminuíram produtividade com a bactéria <i>A. brasiliense</i>	42
Tabela 4. Rank de produtividade (PROD) e índice de seleção distância ideótipo-genótipo (ISDI) dos dez genótipos (GEN) mais e menos produtivos avaliados em quatro ambientes em 2018.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dados quinzenais de umidade relativa (UR), pluviosidade (acúmulo em mm), temperatura mínima, temperatura máxima e temperatura média (em °C) da região de Dourados nos meses de março a julho de 2018 (INMET, 2018).....	27
Figura 2. Dados quinzenais de umidade relativa (UR), pluviosidade (acúmulo em mm), temperatura mínima, temperatura máxima e temperatura média (em °C) da região de Caarapó nos meses de março a julho de 2018 (EMBRAPA, 2018).....	27
Figura 3. Performance de 256 genótipos de milho em relação à eficiência de produtividade e responsividade à <i>A. brasiliense</i> avaliados na segunda safra de 2018 em Dourados. PNR: produtivos e não-responsivos; PR: produtivos e responsivos; NPR: não-produtivos e responsivos; NPNR: não-produtivos e não-responsivos.....	37
Figura 4. Performance de 256 genótipos de milho em relação à eficiência de produtividade e responsividade à <i>A. brasiliense</i> avaliados na segunda safra de 2018 em Caarapó. PNR: produtivos e não-responsivos; PR: produtivos e responsivos; NPR: não-produtivos e responsivos; NPNR: não-produtivos e não-responsivos.....	38
Figura 5. Dados quinzenais de umidade relativa (UR), pluviosidade (acúmulo em mm), temperatura mínima, temperatura máxima e temperatura média (em °C) da região de Dourados nos meses de março a julho de 2018 (INMET, 2018).....	55
Figura 6. Dados quinzenais de umidade relativa (UR), pluviosidade (acúmulo em mm), temperatura mínima, temperatura máxima e temperatura média (em °C) da região de Caarapó nos meses de março a julho de 2018 (EMBRAPA, 2018).....	55
Figura 7. GT <i>Biplot</i> representando a relação entre as variáveis AP: altura de plantas (em metros); CE: comprimento de espiga (em cm); DC: diâmetro de colmo (em cm); IF: intervalo de florescimento (em dias); MCG: massa de cem grãos (em g); NS: nota de sanidade (de 1 a 5); PROD: produtividade (em kg ha ⁻¹ corrigida para 13% de umidade no grão) avaliadas no experimento.....	60
Figura 8. GGE <i>Biplot</i> de discriminação e representatividade dos ambientes para o índice de seleção distância ideótipo-genótipo de 256 genótipos avaliados em Dourados inoculado (DI), Dourados não inoculado (DN), Caarapó inoculado (CI) e Caarapó não inoculado (CN).....	63
Figura 9. GGE <i>Biplot</i> representando o gráfico "quem venceu onde" (which won where) para o índice de seleção distância ideótipo-genótipo de 256 genótipos avaliados em Dourados inoculado (DI), Dourados não inoculado (DN), Caarapó inoculado (CI) e Caarapó não inoculado.....	66

NA INTERAÇÃO COM *Azospirillum brasiliense*

RESUMO GERAL

CECCON, Felipe. Universidade Federal da Grande Dourados. **Seleção de genótipos de milho eficientes na interação com *Azospirillum brasiliense***. 2019. 82 f. Orientador: Dr. Manoel Carlos Gonçalves.

Na cultura do milho, a falta de nitrogênio no desenvolvimento inicial da cultura, bem como a responsividade do genótipo à grandes ofertas do nutriente são fatores que limitam sua produtividade. Todavia, bactérias diazotróficas de vida livre podem auxiliar no aporte de nitrogênio à cultura e liberar substâncias promotoras de crescimento quando inoculadas na semeadura do milho. Porém essa forma de manejo não é capaz de fornecer todo o nitrogênio requerido pela planta, implicando na necessidade de seleção de genótipos eficientes em associar-se com a bactéria para melhorar a simbiose milho-*Azospirillum*. Deste modo, objetivou-se nesse estudo avaliar o desempenho agrônômico de genótipos de milho sob influência da bactéria *Azospirillum brasiliense*, selecionar progênies de eficiente interação com bactérias em ambientes com restrição de nitrogênio e estudar a eficiência da seleção de progênies por meio de um índice multivariado observado no método GGE-*Biplot*. Para isso, foram avaliados 256 genótipos, utilizando o delineamento látice simples 16x16, com dois níveis de inoculação (presença e ausência) e em dois locais (Dourados e Caarapó, no estado do MS). Foram avaliados altura de planta, comprimento de espiga, diâmetro de colmo, intervalo de florescimento, massa de cem grãos, nota de sanidade e produtividade. O efeito da interação dos genótipos com o ambiente foi significativo para as variáveis avaliadas, permitindo o uso de todas para o cálculo do índice de seleção. A resposta do milho ao uso de *Azospirillum brasiliense* é dependente do genótipo e do ambiente e que se inocula. Os genótipos podem aumentar, diminuir ou manter a produtividade quando inoculados em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio. A opção de inocular o milho com *Azospirillum* deve ser considerada quando o genótipo apresenta eficiente associação com a mesma. O índice de seleção multivariado subestimou a produtividade de alguns genótipos, tornando importante o uso das médias dessa variável como parâmetro para a seleção. A inoculação foi eficiente em 14% dos genótipos avaliados indiferentes do local de avaliação. Entretanto, utilizando o índice de seleção, por meio do gráfico GGE *biplot*, juntamente com as médias de produtividade, apenas 29 delas continuam selecionadas como produtivas, estáveis e de eficiente associação com a bactéria.

Palavras-chave: Bactérias diazotróficas, Fixação de nitrogênio, Melhoramento vegetal, *Zea mays* L.

**SELECTION OF MAYZE GENOTYPES EFFICIENT ON
ASSOCIATING TO *Azospirillum brasiliense***

GENERAL ABSTRACT

CECCON, Felipe. **Selection of maize genotypes efficient on associating to *Azospirillum brasiliense***. 2019. 82 p. Orientador: Dr. Manoel Carlos Gonçalves.

In maize culture, the lack of nitrogen in its initial development, as well as the responsiveness of the genotype to large amounts of the nutrient are factors that limit its yield. However, the free-living diazotrophs bacteria are nitrogen assistants in the culture and release growth promoters when inoculated during corn sowing. This inoculation isn't able to provide all the nitrogen required by the plant, implying on selection of maize genotype efficient to associate to the bacteria, improving maize-*Azospirillum brasiliense* symbiosis. This study aimed to study the agronomic performance of corn genotypes under the influence of the *Azospirillum brasiliense* bacteria, to select progenies of efficient interaction with the bacteria in low nitrogen environments and to study the efficiency of progeny selection with a multivariate index seen on a GGE-Biplot. For this, 256 genotypes were evaluated, using a simple 16x16 lattice design, with two levels of inoculation (Dourados and Caarapó, in the state of MS). Plant height, ear length, stalk diameter, flowering interval, weight of one hundred grams, sanity grade and yield were evaluated. The effect of the genotype-environment interaction was significant for all traits, allowing the use of them for the selection index. The response of maize to the use of *Azospirillum brasiliense* is dependent on the genotype and on the environment where it is inoculated. Genotypes may increase, decrease or maintain yield when inoculated with *Azospirillum brasiliense*. The option of to inoculate corn with the bacteria should be when the genotype shows efficient association with it. The multivariate selection index underestimated some genotypes yield, making important to use this variable means as a selection parameter. The inoculation was efficient in 14% of the genotypes regardless of the evaluation site. However, using the selection index, through the GGE biplot chart, along with genotypes yield means, 29 of them were selected as with high and stable yielding and with efficient association to the bacteria.

Keywords: Diazotrophic bactérias, Nitrogen fixation, plant breeding, *Zea mays* L.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O milho é um dos cereais agrícolas mais importantes. O comércio de suas sementes é um dos maiores do mundo e tem exercido grande influência para o valor do cereal no mercado (JAYASINGHE et al., 2010). Os grãos colhidos são utilizados de diversas formas, podendo ser consumido pelos humanos, usado na formulação de rações animais e até para produção de elementos espessantes e colantes na indústria e na produção de óleos e de etanol (FAO, 2018; SERNA-SALDIVAR & ESTHER, 2019).

A produção mundial de milho na safra 2017/2018 foi de 1 bilhão e 76 milhões de toneladas (USDA, 2018). Deste montante o Brasil participou de 8,5% da produção, com destaque para os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul com produtividades médias de respectivamente 7,9 e 6,6 ton ha⁻¹. A produtividade média no estado do Mato Grosso do Sul foi de 3,7 ton. ha⁻¹, aproximadamente uma tonelada a menos que a média nacional (CONAB, 2018).

As maiores produtividades do milho são obtidas com o uso de altas tecnologias, dentre elas deve-se citar o uso de sementes híbridas; resultado do cruzamento entre linhagens endogâmicas (SILVESTRIN-ROVARIS et al., 2017). Entretanto, para responder a tais produtividades, o milho remove grandes quantidades de nitrogênio do solo. Usualmente, a cultura requer o uso de adubação nitrogenada na semeadura e em cobertura para complementar a quantidade fornecida pelo solo. A dose do fertilizante a aplicar é a mais importante decisão no manejo de adubação do ponto de vista econômico, pois para se atingir produtividades acima de 5 ton. ha⁻¹ com híbridos simples de milho são necessários 120 kg ha⁻¹ de nitrogênio (ZUCARELI et al., 2018).

Para a otimização da adubação nitrogenada, o fornecimento do nutriente por meio de fixação de microrganismos, como é fornecido para a cultura da soja, é um aspecto que pode ser considerado na nutrição da cultura do milho. Bactérias diazotróficas são capazes de promover o crescimento de gramíneas por meio da fixação biológica do nitrogênio (FBN), pela produção de fitormônio e pela indução a resistência sistêmica a doenças e estresses ambientais (HUNGRIA et al., 2010). Dentre as bactérias diazotróficas, o gênero *Azospirillum* é o mais comercializado e conhecido por promover o crescimento em milho. Substâncias precursoras de fitormônio foram encontradas e quantificadas em sobrenadantes dos meios de cultura com bactérias desse gênero, sendo o ácido indol-acético, precursor da auxina, a substância encontrada em maior quantidade (BALDANI et al., 2009).

A inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum* pode auxiliar no fornecimento de nitrogênio ao milho, aumentando produtividade com menor dependência de fertilizante industrial (DE SOUZA et al., 2019). Em condições de cultivo de campo e testando três híbridos na presença de inoculação de *Azospirillum*, De Quadros et al. (2014) observaram diferente desempenho dos híbridos em função da inoculação. Um dos híbridos aumentou sua altura quando inoculado e não apresentou diferença significativa na produtividade. Enquanto outro híbrido manteve sua altura, mas aumentou significativamente em produtividade na presença da bactéria.

A inoculação da bactéria também favorece o ambiente. O nitrogênio mineral adicionado ao sistema está sujeito a perdas por lixiviação e volatilização. A quebra da molécula de ureia, transformando-a em amônia, gás carbônico e água, causa perdas de N para a atmosfera. Essas perdas são responsáveis, em parte, pela acidificação das chuvas e conseqüentemente águas nos lençóis freáticos (CHIEN et al., 2009). Sem contar que a forma industrial de obtenção da ureia por meio da amônia requer queimas de combustíveis fósseis não renováveis, aumentando a importância do uso das bactérias fixadoras do nutriente no manejo das culturas.

Desta forma, objetivou-se nesse estudo avaliar o desempenho agrônômico de genótipos de milho sob influência da bactéria *Azospirillum brasiliense*, selecionar progênies de eficiente interação com bactérias em ambientes com restrição de nitrogênio e estudar a eficiência da seleção de progênies por meio de um índice multivariado observado no método GGE-Biplot.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da cultura do milho

O milho é um dos cereais mais consumidos no mundo por ser utilizado na alimentação humana e animal, podendo ser em forma de rações balanceadas ou em grãos (SOARES et al., 2017). Na indústria, o amido de milho é usado no processo de fabricação de elementos espessantes e colantes para a indústria de alimentos (KHALIL, 2000), óleos de resfriamento para motores (FANTA, 2005) e biocombustíveis como o etanol (ACUÑA, 2017).

É uma planta eficiente em armazenar energia que foi domesticada pelo homem a partir de seu ancestral teosinte. Os primeiros cultivos da espécie foram registrados há 7.300 anos em ilhas próximas ao litoral do México e rapidamente se espalhou pelo país. O grão logo se firmou como produto em países da América Central e do Sul, se tornando um dos primeiros itens na cultura mundial. No Brasil, o milho já era cultivado pelos índios antes da chegada dos portugueses, mas foi há cerca de 500 anos que o consumo do cereal no país foi inserido na cultura alimentar do brasileiro (MANGELSDORF, 1947; SMITH & BETRAN, 2004).

A cultura representa grande demanda de produção mundial, sendo que em 2018, a produção mundial da cultura ficou em torno de um bilhão e 76 milhões de toneladas. Os Estados Unidos apresentaram o maior resultado em produção total e por hectare do mesmo ano; colhendo 11 mil kg ha⁻¹ e totalizando 370 milhões de toneladas. A China semeou 42,4 milhões de hectares da cultura em 2018, quase nove milhões a mais que os Estados Unidos, porém em função de suas produtividades em torno de 6 mil kg ha⁻¹, ficou em segundo lugar no ranking de produção de grãos de milho com 259 milhões de toneladas. O Brasil ficou na terceira colocação do ranking, com produção de 91 milhões e 84 mil toneladas colhidas nos 16 milhões e 800 mil hectares que foram semeados da cultura. Entretanto, o país teve produtividade abaixo da média mundial em 2018; foram produzidos 700 kg ha⁻¹ a menos que a média mundial, reforçando a importância de formas de manejo que aumentem a produtividade. O estado de Mato Grosso do Sul é responsável pela semeadura de 10,35% da área total do país. Foram semeados um milhão 740 mil hectares da cultura no estado, de onde se colheram oito milhões e 900 mil toneladas do grão (CONAB; USDA, 2018).

A eficiência de produtividade do milho está relacionada ao tipo de metabolismo (MAGALHÃES et al., 1996). Sendo considerado de metabolismo C4, apresenta alta

eficiência na utilização de luz e CO_2 . Conseqüentemente demandando maior quantidade de nutrientes para a manutenção de um metabolismo mais completo em comparação ao metabolismo C3. Plantas C4 apresentam a enzima PEPcase em seu aparato fotossintético que, em condições de temperaturas elevadas, permite que a planta mantenha a concentração de CO_2 no interior da célula. Desta forma, o metabolismo de produção da planta pode manter suas atividades mesmo em temperaturas elevadas (PEARCY et al., 1984).

Com maior taxa fotossintética, aumentam a necessidade por água e nutrientes na planta (BERGAMSCHI et al., 2006). Dentre os macronutrientes necessários para o milho, o nitrogênio é um dos mais limitantes por exercer diversas funções na planta. A disponibilidade de nitrogênio é fator que influencia na deposição de matéria seca no milho durante a antese (MOLLA et al., 2018), tornando o nitrogênio um elemento muito limitante na produção do grão.

2.2 Nitrogênio

O nitrogênio é um elemento químico que, em sua forma elementar (N_2), é um gás inerte correspondente à 79% da atmosfera terrestre. Entretanto, apenas 0,04% desse elemento está na forma combinada orgânica ou inorgânica presente no solo, em plantas ou em animais. Seu ciclo consiste em transformações entre suas formas por meio de processos físicos, químicos ou biológicos (KÖRSCHENS et al., 2013).

Em sua forma mais abundante na atmosfera, o elemento apresenta uma ligação química muito forte e estável, a qual precisa ser quebrada para a redução ao amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-). A quebra dessa ligação pode ser originada de i) queimas industriais: processos altamente energéticos e onerosos pelo qual os nutrientes químicos são obtidos, ii) atividades vulcânicas: pouco abundante e inviável para a agronomia, iii) mineralização da matéria orgânica e iv) organismos fixadores de nitrogênio: fungos e bactérias com aporte enzimático para essa quebra de ligação. Após essa quebra, o nitrogênio reage com o hidrogênio ou o oxigênio formando posteriormente os compostos amônio ou nitrato que ficam disponíveis às plantas (NUNES et al., 2003).

Com 80 dias após a emergência, cerca de 2,3 g de nitrogênio são exportados do solo pela planta de milho (BORIN et al., 2010). Com isto é necessário incorporar ao solo anualmente uma reposição do nitrogênio após a colheita das espigas, de outra maneira o solo ficaria exaurido diminuindo a produtividade na safra seguinte. Lovato et al. (2004)

mostram que o uso do plantio direto rotacionado com culturas leguminosas pode adicionar até 178 kg ha⁻¹ de nitrogênio, porém o sistema de rotação ainda é subutilizado em comparação ao sistema de sucessão entre soja e milho, onde essas adições de nitrogênio são feitas por meio do fertilizante mineral fabricados com alto custo em indústrias.

O processo de sintetização de amônia a partir do N gasoso ($N_2 + 3H_2 \rightarrow 2NH_3$), descrito pelos cientistas Haber e Bosch no século XX, foi considerada uma das mais importantes descobertas no século. Entretanto, o processo de quebra da ligação tripla dos átomos de nitrogênio feita nas indústrias requer temperaturas de 400°C e pressões até 190 vezes maior que a atmosférica, o que implica em grandes queimas de petróleo para que essas condições sejam atingidas (VOJVODIC et al., 2014). A fixação industrial é então um processo caro ainda muito utilizado na agricultura à custa de combustíveis fósseis não renováveis, caracterizando um processo não sustentável.

A fixação biológica do nitrogênio é realizada por bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) (MAJEED et al., 2018). O gênero *Azospirillum* abrange um grupo de BPCP de vida livre, encontrado em quase todos os solos da terra, que ganhou importância na pesquisa quando descobriu-se sobre sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio em gramíneas (HUNGRIA et al., 2010).

As plantas absorvem o nitrogênio tanto na forma amoniacal como em nitrato. Para a absorção do amônio, o mesmo deve ser incorporado em compostos orgânicos nas raízes, enquanto o nitrato pode ser transportado no xilema e armazenado nos vacúolos das células. Entretanto o nitrato precisa voltar à sua forma amoniacal para ser assimilado na síntese de clorofila, desta forma o nitrogênio exerce funções fundamentais na planta em qualquer forma química que o nutriente foi absorvido. Na forma de nitrato, ele favorece o equilíbrio de cargas, auxilia a absorção de íons e reações de síntese nas células. O nitrogênio também realiza funções estruturais fazendo parte da constituição das moléculas de DNA, proteínas e outros compostos orgânicos da célula (KERBAUY, 2008).

A demanda de nitrogênio pela cultura se torna elevada por ele ser um nutriente fundamental ao crescimento e desenvolvimento da planta. A adição de nitrogênio mineral ao sistema está sujeita a perdas por lixiviação e volatilização. A urease é uma enzima produzida por microrganismos do solo que facilita a quebra da molécula de ureia, transformando-a de volta em amônia, gás carbônico e água, causando altas perdas de N para a atmosfera (BRAMORSKI et al., 2015). O nitrato é a forma mineral de nitrogênio predominante nos solos sem restrição de oxigênio. Devido ao predomínio de cargas

negativas em solos de pH menor que 7, a sua adsorção eletrostática é insignificante. Desta forma, o nitrato permanece na solução do solo, o que favorece sua lixiviação no perfil para profundidades inexploradas pelas raízes (CERETTA & FRIES, 1997).

Desta forma, a inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio em milho pode ser uma ferramenta que auxilia no fornecimento de nitrogênio a cultura. Assim, deve-se intensificar pesquisas voltadas ao estudo da associação entre bactérias fixadoras de nitrogênio com a cultura do milho, de maneira que favoreça ao aumento de produtividade.

2.3 Efeitos da inoculação com *Azospirillum*

A interação de plantas com organismos diazotróficos, ou seja, fixadores de nitrogênio, é um dos mais importantes processos da natureza. O exemplo mais utilizado é o da soja com a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* (ALBINO & CAMPO; CAMPOS et al., 2001; BUENO et al., 2003). Estudos sobre a relação de organismos fixadores de nitrogênio e plantas da família Poaceae ganharam seu destaque a partir da década de 50 com a descoberta da interação positiva entre a bactéria *Beijerinckia fluminensis* em algumas plantas de cana-de-açúcar (BALDANI et al., 2009). Existem atualmente os inoculantes, que são soluções contendo estirpes de bactérias utilizadas como produto fonte de inóculo para que as mesmas possam fornecer amônio na rizosfera. São comumente utilizados como os tratamentos de semente, com a diferença de que o inoculante precisa ser incorporado à semente horas antes da semeadura, em comparação com tratamentos químicos contra pragas que vêm aplicados de fábrica (DIAS et al., 2018).

O gênero *Azospirillum* ganhou grande destaque mundialmente a partir da década de 70 com a descoberta feita pela pesquisadora da Embrapa, Dra. Johanna Döbereiner (1924-2000), que descobriu a capacidade de fixação biológica do nitrogênio que essas bactérias apresentam quando inoculadas com gramíneas (DÖBEREINER et al., 1976). O gênero é o mais comercializado e conhecido por promover o crescimento em milho. As bactérias, inicialmente classificadas como de vida livre a atualmente como endofítica facultativa, colonizam os espaços intercelulares das raízes da planta para fixar o nitrogênio e transferir o amônio (HUNGRIA et al., 2010).

Nesse gênero, algumas espécies tem maior capacidade de colonização por produzirem elevadas quantidades de substâncias de armazenamento dentro das células, como os polihidroxialcanoatos (PHA) e polihidroxibutirato (PHB). Esses compostos são

carboidratos às bactérias; fontes de energia e carbono que são utilizados pela mesma em condições de estresse, propiciando à bactéria boas condições de competição. A espécie *A. brasiliense* é a que mais produz esses compostos, sendo a limitação de oxigênio e alta relação C/N dois fatores que estimulam essa produção em suas células (SUN et al., 2002).

Para um híbrido simples de milho, os resultados da inoculação de *Azospirillum* na semeadura mostraram que a mesma é uma forma de manejo viável para a diminuição de fertilizantes químicos nitrogenados (PORTUGAL et al., 2016). A interação entre inoculação da bactéria e adubação nitrogenada com metade da dose recomendada na semeadura tem sido uma opção econômica e ecologicamente viável para o sorgo (ABBASDOKHT et al., 2016), a mandioca (HRIDYA et al., 2012) e gergelim (SHAKERI et al., 2015).

Além da fixação de nitrogênio em forma de amônio, foi detectada a presença de substâncias promotoras de crescimento de plantas em sobrenadantes dos meios de cultura com *Azospirillum*. O processo baseado em isolar a bactéria, inocular em plantas, coletar raízes e quantificar a presença de substâncias precursoras de hormônios foi o mais utilizado em experimentos. Autores já detectaram presença de auxinas (CROZIER et al., 1988; BAR & OKON, 1993), citocininas (HOREMANS et al., 1986; CACCIARI et al., 1989) e giberelinas (BOTTINI et al., 1989), porém, a produção de auxinas é quantitativamente mais importante. A presença desses hormônios chamou atenção das pesquisas com *Azospirillum* em co-inoculação com outras culturas, como a soja (ZUFFO et al., 2015) e o feijão (ARAUJO et al., 2018).

A auxina foi o primeiro fitormônio estudado e, com base nele, iniciaram os estudos de mecanismos de expansão da célula vegetal. Em sua forma natural, o hormônio é conhecido como ácido indol-acético, sendo a mais abundante e de maior relevância fisiológica nas plantas (TAIZ & ZEIGER, 2013). Seus efeitos são o alongamento celular e a dominância apical, aumentando crescimento e desenvolvimento dos ápices das plantas (NARULA et al., 2005). Entretanto, esses efeitos não necessariamente implicam em aumento de produtividade. A inoculação de *Azospirillum* em híbridos de milho pode afetar de maneira indesejada a produtividade de grãos, por depender da forma como cada híbrido responde a inoculação (DE QUADROS et al., 2014). Essa diferença de resposta dos híbridos é uma característica que pode ser levada em consideração na seleção de genótipos num programa de melhoramento. Genótipos que apresentarem maiores produtividades na presença de *Azospirillum brasiliense* são considerados de eficiente interação com a bactéria e de interesse em um programa.

2.4 Melhoramento para eficiência no uso de *Azospirillum*

No início do século XX, ainda era forte a crença de que a mutação genética era a única ferramenta que levava à evolução das espécies e não se considerava a seleção natural. Foi nas décadas de 1930 e 1940 que a teoria moderna da evolução, ou teoria sintética, se tornou bastante abrangente, quando, dentre outros cientistas, o biólogo e geneticista Theodosius Dobzhansky (1900 – 1985) definiu a evolução como uma mudança na frequência de alelos dentro de um *pool* gênico. Com isso, passou-se a acreditar que as alterações no código genético de bases nitrogenadas do DNA são responsáveis por novos alelos e as recombinações desses alelos durante a evolução são responsáveis pelas novas combinações gênicas, gerando variabilidade genética. O novo alelo tende a ser preservado por meio da seleção natural e essa mutação permite alterações na molécula de DNA, podendo ocasionar mudanças de fenótipo (DOBZHANSKY, 1982).

Esses estudos exerceram grande influência no melhoramento de milho, resultando em metodologias de melhoramento baseadas nas teorias de genética populacional, conforme Darwin já havia proposto (De ALMEIDA & FALCÃO, 2010). A seleção antrópica das maiores espigas advindas das melhores plantas é a origem do melhoramento de genótipos de milho. A seleção passou a ser mais eficiente com o auxílio da estatística, quando se passou a considerar características hereditárias e não hereditárias na seleção e o uso de mensuração de características na planta (DARRAH et al., 2019). Começaram a surgir os índices de seleção de genótipos, nos quais se atribuíam pesos às características para se obter um valor genético que melhor discriminasse os genótipos a serem selecionados (SMITH, 1936; HAZEL, 1943; YOUSEF et al., 2001; JAFARI et al., 2012).

Desde a década de 40 então, com o melhoramento de milho, houveram aumentos significativos de produtividade no Brasil (VENCOVSKY et al., 1988; FIDELIS et al., 2010). Por meio da variabilidade genética, o melhorista conseguiu genótipos mais resistentes e adaptados que contribuíram para a evolução da espécie. A recombinação gênica, feita pela distribuição independente dos cromossomos não homólogos durante a meiose aumenta a variabilidade genética (RAMALHO et al., 2012), conferindo características de adaptação à população e mais genótipos que podem ser utilizados em programas de melhoramento.

A hibridação de indivíduos de duas espécies é um exemplo desses processos que permitem aumento da produtividade, variabilidade genética e manutenção da adaptação dos genótipos à fatores ambientais (NASS et al., 2000; AGUIAR et al., 2003). O uso de híbridos é muito importante devido ao efeito de heterose após o cruzamento de linhagens divergentes. Genótipos de eficiente associação com *A. brasiliense* são autofecundados até que a maioria dos alelos nos locos dos cromossomos estejam em homozigose, sejam eles recessivos ou dominantes FERREIRA et al., 2009). Após essa etapa, linhagens eficientes na associação e geneticamente divergentes são cruzadas e o efeito dos alelos de cada uma delas é expresso na F1 por meio do efeito da heterose. A expressão fenotípica do genótipo formado é notada por maior vigor de planta e produtividade de grãos (HALLAUER et al., 2010), quando inoculados a priori da semeadura.

Para a eficiência na seleção de genitores de eficiente interação com a bactéria num programa de melhoramento, são utilizados parâmetros genéticos que auxiliam na decisão. Em um delineamento experimental onde esteja testando progênes de milho quanto à eficiente interação à bactéria em mais de um local, a variação das características fenotípicas mensuradas nas parcelas é desdobrada em variâncias genéticas e ambientais para a obtenção de parâmetros genéticos na presença da bactéria (CRUZ et al., 2014).

Para a seleção dos genótipos com efeito fixo, o coeficiente de determinação genotípica é um parâmetro atribuído às variáveis mensuradas nas plantas. Assim como a herdabilidade, ele é expresso em porcentagem e representa a importância dessa característica na seleção e quanto aquela característica pode ser expressa na F₁ do genótipo (YOKOMIZA & VELLO, 2000; MAPHUMULO et al., 2015). A bactéria *Azospirillum brasiliense* pode afetar o ciclo da planta de milho (CURÁ et al., 2017), o que infere na necessidade de se selecionar genótipos que mantenham produtividade quando inoculados. Entretanto, a alteração na expressão fenotípica consequente da inoculação não é hereditária, implicando em dificuldade na ponderação das variáveis estudadas no experimento (VIDOTTI, 2018). Quanto mais parâmetros se tiver para a seleção dos genótipos eficientes na associação por meio de características avaliadas em ambientes, melhor será o desempenho agrônomo dos genótipos selecionados quando inoculados com a bactéria (NASCIMENTO-JÚNIOR et al., 2018).

A alteração no desempenho de um genótipo causada pela influência do ambiente é conhecida como interação genótipo-ambiente (GxE), podendo essa existir ou não. A detecção dessa interação é de grande importância na seleção de genótipos, para que aqueles

que melhor se adaptarem às alterações ambientais ou mais estáveis perante essas mudanças sejam avançados em programas de seleção. O mesmo serve para a seleção de genótipos responsivos à inoculação, eles devem apresentar a capacidade de aproveitar vantajosamente o estímulo da bactéria e ter desempenho previsível quando inoculados (BORÉM & MIRANDA, 2013).

Para entender o efeito da associação genótipos-bactéria, serão necessários vários genótipos de milho e da bactéria e experimentos por vários anos e/ou locais para se avaliar a magnitude da interação e seu possível impacto sobre a seleção e a recomendação de genótipos. A fim de tornar essa recomendação a mais segura possível, são necessários procedimentos estatísticos que permitam separar os efeitos das interações dos genótipos, da bactéria e dos ambientes, revelando a contribuição relativa de cada um para a interação total (SILVA & DUARTE, 2006). Desta forma a seleção de genótipos eficientes na associação com bactérias fixadoras requer precisão na coleta de dados e escolha do método estatístico a usar (HALLAUER et al., 2010).

2.5 Distância genética e GGE-Biplot na seleção de genótipos de milho.

Análise multivariada é um conceito estatístico que envolve a avaliação simultânea de características, correlacionadas ou não, mensuradas numa mesma parcela. Ela agrupa informações de diversas variáveis permitindo a melhor compreensão da variância em um indivíduo. As variáveis originais (X) são agrupadas e transformadas em novas variáveis (Y), podendo ser denominadas componentes principais (CP). Eles são combinações lineares de todas as variáveis originais, de forma que os primeiros componentes contêm maior parte da variação total dos dados e, conseqüentemente, os últimos representam menor parte da variação (DARRAH, 2019).

Cada variável original tem um peso no CP, desta forma, as que apresentarem maior peso nos primeiros componentes são mais importantes para o estudo, conseqüentemente as que apresentarem maior peso nos últimos CP são de menor importância na interpretação da variação do experimento, podendo ser descartadas na hora da interpretação. Índices de seleção são metodologias utilizadas para resumir as variáveis originais. Reis et al. (2017), por exemplo, calcularam um índice multivariado para auxiliar na seleção dos genótipos. Foi obtida a distância generalizada, de cada parcela do experimento, a um valor ideal para todas as características avaliadas de forma a gerar um parâmetro que auxiliou na avaliação. Nesse

exemplo citado, o índice alterou o rank de genótipos e a seleção dos genótipos.

No melhoramento de plantas, a estatística multivariada é uma ferramenta utilizada no estudo de distância genética entre indivíduos e famílias (RODGERS-MELNICK et al.; SINGH, 2015). Existem metodologias para se agrupar indivíduos em função das diferenças numéricas observadas entre eles que permitem melhor compará-los. A distância Euclidiana é uma medida de dissimilaridade utilizada para dados quantitativos calculada pela equação $d_{ij} = \sqrt{\sum_{p=1}^p (Y_{ij} - Y_{i'j})^2}$. Nessa fórmula, Y_{ij} é o valor observado de uma variável j no indivíduo i , $Y_{i'j}$ é o valor para essa variável observada no indivíduo i' e p é o número de variáveis mensuradas nos dois indivíduos (HAIR et al., 2009).

É importante que se leve em consideração a variação que existe numa característica que foi mensurada, bem como a sua relação linear com as demais observações avaliadas em um indivíduo. Para isso, a distância generalizada de Mahalanobis pondera as diferenças entre essas observações por meio da matriz de variância e covariância das mesmas, passando a ser bastante utilizada por levar em consideração as correlações das variáveis (RIGON et al., 2012). Neste método, aumentam as distâncias entre indivíduos permitindo melhor visualização dos grupos num plano cartesiano. A distância é calculada por meio da equação $D^2 = d' S^{-1} d$, em que d é o vetor das diferenças entre os indivíduos para as características mensuradas e S^{-1} é a matriz inversa da matriz de variância e covariância das variáveis padronizadas (HAIR et al., 2009).

A distância generalizada de Mahalanobis calculada entre indivíduos pode ser utilizada para torna-se uma variável calculada que pondera as variáveis observadas nos indivíduos. A distância dos indivíduos em avaliação de um genótipo testador pode ser considerada uma variável de avaliação. Entretanto, essa nova variável é uma combinação de efeitos do genótipo (G), do ambiente (E) e da interação entre eles (GE), enquanto apenas os efeitos de G e GE são relevantes para a avaliação de genótipos (YAN et al., 2000).

Tendo em vista isso, Yan et al. (2007) propuseram o método GGE *Biplot* como forma de visualização dos efeitos que envolvem os genótipos. A análise proposta é feita por meio do modelo:

$$\bar{Y}_{ij} - \mu_j - \beta_j = \lambda_1 \xi_{i1} \eta_{1j} + \lambda_2 \xi_{i2} \eta_{2j} + \varepsilon_{ij}$$

Em que:

- \bar{Y}_{ij} é o valor médio da variável em estudo do genótipo i no ambiente j ;
- μ_j é a média da variável no ambiente j ;
- β_j é o efeito principal do ambiente j ,

- λ_1 e λ_2 são os maiores autovalores dos componentes principais (CP) 1 e 2 da análise de componentes principais (ACP);
- ξ e η são autovetores de cada componente referentes ao genótipo e ao ambiente respectivamente.

O método permite visualização de genótipos e ambientes superiores por meio de gráficos bidimensionais (*Biplot*) construídos com autovalores e autovetores dos componentes principais. Levando em consideração que os autovetores dos genótipos no CP1 são quase-perfeitamente correlacionados com os efeitos principais do genótipo, indivíduos com grande autovetor no CP1 e pequeno no CP2 apresentam produtividade elevada e estável entre os ambientes testes (YAN et al., 2000). A construção de gráficos possibilita a observação de qual genótipo teve maior desempenho em qual ambiente (*which won where*), bem como a visualização da adaptabilidade dos genótipos e detecção de um ideal (YAN & TINKER, 2006).

Nesse contexto, a utilização dos métodos de distância genética de Mahalanobis para construção de um índice de seleção combinado com o método GGE *Biplot* para estudo de adaptabilidade e estabilidade de genótipos auxilia na seleção de genótipos superiores; produtivos e estáveis (OLIVEIRA et al., 2014).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASDOKHT, H.; CHAICHI, M. R.; ASADI, S.; NAZARI, M.; NORAN, M. M.; KHADEMI, H. R. Effects of types of nitrogenous fertilizer (biological, chemical, integrative) and cropping mixes on some forage-medicine characteristics in additive intercropping of sorghum (*Sorghum bicolor* [L.] Moench) with fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 62, n.12, p. 1741-1752, 2016.

ACUÑA, E.; CANCINO J.; RUBILAR, R. PARRA, C. Bioethanol potential from high density short rotation woody crops on marginal lands in central Chile. **Cerne**, v.23, n.1, p.133-145, 2017.

ALBINO, U. B.; CAMPO, R. J. Efeito de fontes e doses de molibdênio na sobrevivência do *Bradyrhizobium* e na fixação biológica de nitrogênio em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.3, p.527-534, 2001.

AGUIAR, A. M.; CARLINI-GARCIA, L. A.; DA SILVA, A. R.; SANTOS, M. F.; GARCIA, A. A. F.; DE SOUZA JR, C. L. Capacidade de combinação de linhagens endogâmicas de milho e estabilidade de seus respectivos híbridos. **Scientia Agricola**, v.60, n.1, p.83-89, 2003.

ARAUJO, E. O.; MAUAD, M.; TADEU, H. C.; LIMA FILHO, H. A. Yield of cowpea genotypes inoculated with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum brasilense* in association with phosphate fertilization in amazonian soil. **Journal of Agricultural Science**, v.10 n.12, 2018.

BALDANI, J.I.; TEIXEIRA, K.R.S.; SCHWAB, S.; OLIVARES, F.L.; HEMERLY, A.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; NOQUEIRA, E.M.; ARAUJO, J.L.S.; BORGES, L.E.; SOARES, L.H.B.; VINAGRE, F.; BALDANI, V.L.D.; CARVALHO, T.L.G.; ALVES, B.J.R.; JAMES, E.K.; JANTALHA, C.P.; FERREIRA, P.C.G.; VIDAL, M.S.; BODDEY, R.M. Fixação biológica de nitrogênio em plantas da família Poaceae (Antiga Graminae). In: RIBEIRO, M.R.; NASCIMENTO, C.W.A.; DO FILHO, M.R.R.; CANTALICE, J.R.B. **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa, Sociedade Brasileira Ciência do Solo. v.6, p.203-271, 2009.

BAR, T. & OKON, Y. Tryptophan conversion to indole-3-acetic acid via indole-3-acetamide in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Canadian Journal of Microbiology**, v.39, p.81-86, 1993.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian journal of microbiology**, v.50, n.8, p.521-577, 2004.

BERGAMASCHI, H.; DALMAGO, G. A.; COMIRAN, F.; BERGONCI, J. I.; MÜLLER, A. G.; FRANÇA, S.; PEREIRA, P. G. Déficit hídrico e produtividade na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.2, p.243-249, 2006.

BORÉM, Aluizio; MIRANDA, Glauco VIEIRA. **Melhoramento de plantas**, Editora UFV, 6ª Ed., 523p, 2013.

BORIN, A. L. D. C.; LANA, R. M. Q.; PEREIRA, H. S. Absorção, acúmulo e exportação de macronutrientes no milho doce cultivado em condições de campo. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, n.1, p.1591-1597, 2010.

BOTTINI R, FULCHIERI M, PEARCE D, PHARIS R. Identification of gibberellins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Plant Physiology**, v.90, p.45-47, 1989

BUENO, C. J.; MEYER, M. C.; DE SOUZA, N. L. Efeito de fungicidas na sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* (Semia 5019 e Semia 5079) e na nodulação da soja. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.25, n.1, p.231-235, 2003.

BRAMORSKI, J.; TRIVELIN, P. C. O.; CRESTANA, S. Nitrogen loss by erosion from mechanically tilled and untilled soil under successive simulated rainfalls. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.39, n.4, p.1204-1211, 2015.

CACCIARI, I.; LIPPI, D.; IPPOLITI, S.; DEL GALLO, M.; PIETROSANTI, T.; PIETROSANTI, W. Growth and nitrogen fixation of mixed cultures of *Azospirillum brasilense* and *Arthrobacter giacomelloi*. In: **Advances in Nitrogen Fixation Research**. Springer Netherlands, p.329-329, 1984.

CAMPOS, B. C.; HUNGRIA, M.; TEDESCO, V. Eficiência da fixação biológica de N₂ por estirpes de *Bradyrhizobium* na soja em plantio direto. **Revista brasileira de ciência do solo**, v.25 n.3, p.583-592, 2001.

CERETTA, C.A; FRIES, M.R. Adubação nitrogenada no sistema de plantio direto. In: NUERNBERG, N.J. Plantio direto: conceitos, fundamentos e práticas culturais. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, Núcleo Regional Sul. Cap.7, p.111-120, 1997.

CHIEN, S. H.; PROCHNOW, L. I.; CANTARELLA, H. Recent Developments of Fertilizer Production and Use to Improve Nutrient Efficiency and Minimize Environmental Impacts. **Advances in Agronomy**, v.102, 267–322, 2009.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Primeiro levantamento. v. 6 - safra 2018/19. ISSN: 2318-6852. Outubro de 2018. Brasília. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em: 1 nov. 2018.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J. M.; MONTEIRO, A. M.; SANDBERG, G. Analysis of indole-3-acetic acid and related indolis in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2833-2837, 1988.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao**

melhoramento genético, v.2, 3ª Edição, Viçosa: Editora UFV, 668 p, 2014.

CURÁ, J. A.; FRANZ, D. R.; FILOSOFÍA, J. E.; BALESTRASSE, K. B.; BURGUEÑO, L. E. Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. Bacteria Increases the Tolerance of Maize to Drought Stress. **Microorganisms**. v.5, n.3, p.41, 2017.

DARRAH, L. L.; MCMULLEN, M. D.; ZUBER, M. S. Breeding, genetics and seed corn production. In: **Corn**, 3ªEd, AACC International Press, p.19-41, 2019.

DE ALMEIDA, A. V.; FALCÃO, J. T. da R. As teorias de Lamarck e Darwin nos livros didáticos de Biologia no Brasil. **Ciência & Educação (Bauru)**, v.16, n.3, p.649-665, 2010.

DE QUADROS, P. D.; ROESCH, L. F. W.; DA SILVA, P. R. F.; VIEIRA, V. M.; ROEHRS, D. D.; DE OLIVEIRA CAMARGO, F. A. Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v.61, n.2, p.209-218, 2014.

DE SOUZA, E. M.; GALINDO, F. S.; TEIXEIRA FILHO, M.; DA SILVA, P. R.; DOS SANTOS, A. C.; FERNANDES, G. C. Does the nitrogen application associated with *Azospirillum brasilense* inoculation influence corn nutrition and yield? **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi**, v.23, n.1, p.53-59, 2019.

DIAS, V. C.; PELUZIO, J. M.; LIMA, M. D.; REINA, E. *Azospirillum brasilense* and nitrogen in the yield of corn oil, in off-season cultivation, under low latitude. **Journal of bioenergy and food science**, v.5, n.4, p.106-118, 2018.

DÖBEREINER, J.; MARRIEL, I.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**, v.22, p.1464-1473, 1976

DOBZHANSKY, Theodosius Grigorievich. **Genetics and the Origin of Species**. Columbia University Press, 3ª Ed., p.367, 1982.

FALCONER, Douglas Scott. **Introduction to quantitative genetics**. Oliver And Boyd; Edinburgh; London, p.371, 1960.

FANTA, G. F.; FELKER, F. C.; SHOGREN, R. L.; BYARS, J. A.; SALCH, J. H. Crystalline particles formed in slowly-cooled cornstarch dispersions prepared by steam jet cooking. The effect of starch concentration, added oil and rate of cooling. **Carbohydrate polymers**, v.61, n.2, p.222-230, 2005.

FAO. FAOSTAT. Food and agriculture data. 2018. <http://www.fao.org/faostat/en/#home>

FERREIRA, J. M.; MOREIRA, R. M. P.; HIDALGO, J. A. F. Capacidade combinatória e heterose em populações de milho crioulo. **Ciência Rural**, v.39, n.2, p.332-339, 2009.

FIDELIS, R. R., MIRANDA, G. V., PELÚZIO, J. M., GALVÃO, J. C. C. Corn population classification as to efficiency and response to phosphorus use. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.32, n.2, p.241-246, 2010.

FISHER R. A. Statistical Methods for Research Workers. In: KOTZ S.; JOHNSON N. L. (eds) **Breakthroughs in Statistics**. Springer Series in Statistics (Perspectives in Statistics).

Springer, New York, NY, p.66-70, 1992.

HAIR, J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. **Análise multivariada de dados**, 6 ed, Bookman Editora, p.682, 2009.

HALLAUER, Arnel R.; MIRANDA FILHO, J. B. de; CARENA, Marcelo J. Heterosis. In: **Quantitative genetics in maize breeding**. Springer, New York, NY, p. 477-529, 2010.

HOREMANS, S., ONCKELEN, H. V., & GREEF, J. D. Longitudinal gradients of indole-3-acetic acid and abscisic acid in the hypocotyl of etiolated bean seedlings." **Journal of experimental botany**, v.37, n.10, p.1525-1532. 1986.

HRIDYA, A.C.; BYJU, G.; MISRA, R. S. Effect of biocontrol agents and biofertilizers on root rot, yield, harvest index and nutrient uptake of cassava (*Manihot esculanta Crantz*). **Archives of Agronomy and Soil Science**. v. 59, n.9, p.1215-1227, 2012.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**. v.331, n.1-2, p.413-425, 2010.

JAYASINGHE, S.; BEGHIN, J. C.; MOSCHINI, G. Determinants of world demand for US corn seeds: the role of trade costs. **American Journal of Agricultural Economics**, v.92, n.4, p.999-1010, 2010.

JAFARI, A., PAKNEJAD, F. A. R. Z. A. D., JAMI, A. A. Evaluation of selection indices for drought tolerance of corn (*Zea mays* L.) hybrids. **International Journal of Plant Production**, v.3, n.4, p.33-38, 2012.

JOLLIFFE, I. T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v.374, n.2065, p.202-217, 2016.

KERBAUY, Gilberto Barbante. **Fisiologia Vegetal**. 1 ed. Guanabara: Koogan, p.472, 2004.

KHALIL, A. H. Quality characteristics of low-fat beef patties formulated with modified corn starch and water. **Food Chemistry**, v.68, n.1, p.61-68, 2000.

KÖRSCHENS, M.; ALBERT, E.; ARMBRUSTER, M.; BARKUSKY, D.; BAUMECKER, M.; BEHLE-SCHALK, L.; HOFFMANN, S. Effect of mineral and organic fertilization on crop yield, nitrogen uptake, carbon and nitrogen balances, as well as soil organic carbon content and dynamics: results from 20 European long-term field experiments of the twenty-first century. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v.59, n.8, p.1017-1040, 2013.

LOVATO, T.; MIELNICZUK, J.; BAYER, C.; VEZZANI, F. Adição de carbono e nitrogênio e sua relação com os estoques no solo e com o rendimento do milho em sistemas de manejo. **Revista brasileira de ciência do solo**. Campinas. v. 28, n. 1, p. 175-187, 2004

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; GOMIDE, R. L. Fisiologia da cultura do milho. In: BENASSI, A.C.; FULLIN, E.A.; SILVA, J.G.F.; ZANGRANDE, M.B.; FERRAO, R.G.; MARTINS, D.S.; VENTURA, J.A.; DURAES, F.O.M.; SILVA, J.G.; GOMIDE,

R.L.; MAGALHAES, P.C.; RESENDE, C.I. **Manual técnico para a cultura do milho no Estado do Espírito Santo**. Vitoria: EMCAPA. v.1, p.15-34, 1996.

MAJEED, A.; MUHAMMAD, Z.; AHMAD, H. Plant growth promoting bacteria: role in soil improvement, abiotic and biotic stress management of crops. **Plant Cell Report**, v.37, p.1599-1609, 2018.

MANGELSDORF, P. C. The origin and evolution of maize. **Advances in genetics**. v. 1, p. 161-207, 1947.

MAPHUMULO, S. G.; DERERA, J.; QWABE, F.; FATO, P.; GASURA, E. Heritability and genetic gain for grain yield and path coefficient analysis of some agronomic traits in early-maturing maize hybrids. **Euphytica**, v.206, n.225, p.225-244, 2015.

MOLLA, Md. S.H.; NAKASATHIEN, S.; ALI, Md. A.; KHAN, A.; ALAM, Md. R.; HOSSAIN, A.; FAROOQ, M.; El SABAGH, A. Influence of nitrogen application on dry biomass allocation and translocation in two maize varieties under short pre-anthesis and prolonged bracketing flowering periods of drought. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v.65, n.3, 2018.

NARULA, N.; SAHARAN, B. S.; KUMAR, V.; BHATIA, V.; BISHNOI, L. K.; LATHER, B.P.S.; LAKSHMINARAYANA, K. Impact of the use of biofertilizers on cotton (*Gossypium hirsutum*) crop under irrigated agro-ecosystem. **Archives of Agronomy and Soil Science**. v. 51, n.1, p.69-77, 2005.

NASCIMENTO-JÚNIOR, I.; MORO, G. V.; MORO, F. V. Indirect selection of maize genotypes based on associations between root agronomic and anatomical characters. **Chilean journal of agricultural research**, v.78, n.1, p.39-47, 2018.

NASS, L. L.; LIMA, M.; VENCOVSKY, R.; GALLO, P. B. Combining ability of maize inbred lines evaluated in three environments in Brazil. **Scientia Agricola**, v.57, n.1, p.129-134, 2000.

NUNES, F. S., RAIMONDI, A. C., & NIEDWIESKI, A. C. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. **Química Nova**, v.26, n.6, p.872-879, 2003.

OLIVEIRA, R. L. De; PINHO, R. G. V.; FERREIRA, D. F.; PIRES, L. P. M.; MELO, W. M. C. Selection index in the study of adaptability and stability in maize. **The Scientific World Journal**, v.2014, p.1-6, 2014.

PEARCY, R. W., & EHLERINGER, J. Comparative ecophysiology of C3 and C4 plants. **Plant, Cell & Environment**, v.13, n.1, p.1-13, 2004.

RAMALHO, M; DOS SANTOS, J. B.; PINTO, C. B.; SOUZA, E. A.; GONÇALVES, F. M. A.; SOUZA, J. C. **Genética na agropecuária**. 5 ed. UFLA, 565p, 2012.

REIS, G. G. D.; PEREIRA, F. B.; GRANATO, I. S. C.; DOVALE, J. C.; FRITSCHENETO, R. Tropical maize selection indexes genotypes for efficiency in use of nutrients: phosphorus. **Revista Ceres**, v.64, n.3, 266-273, 2017.

RIGON, J. P. G.; CAPUANI, S.; DE BRITO NETO, J. F.; DA ROSA, G. M.; WASTOWSKI, A. D.; RIGON, C. A. G. Dissimilaridade genética e análise de trilha de cultivares de soja avaliada por meio de descritores quantitativos. **Ceres**, v.59, n.2, 2012.

RODGERS-MELNICK, E.; BRADBURY, P. J.; ELSHIRE, R. J.; GLAUBITZ, J. C.; ACHARYA, C. B.; MITCHELL, S. E.; BUCKLER, E. S. Recombination in diverse maize is stable, predictable, and associated with genetic load. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.112, n.12, p.3823-3828, 2015.

RUDNICK, P.; MELETZUS, D.; GREEN, A.; HE, L.; KENNEDY, C. Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 831-841, 1997.

SERNA-SALDIVAR, S. O.; ESTHER, P. C. Food uses of whole corn and dry-milled fractions. In **Corn**, pp. 435-467. AACC International Press, 2019.

SILVESTRIN-ROVARIS, S. R.; DE ARAÚJO, P. M.; DOMINGOS GARBUGLIO, D.; GUIARETTA DE AZEVEDO, C. V.; CAVENAGHI PRETE, C. E. Genetic characterization of the 28 maize landraces in Paraná State. **Semina: Ciências Agrárias**, v.38, n.4, 2017.

SINGH, P. R. A. V. E. E. N. Genetic distance, heterosis and combining ability studies in maize for predicting F1 hybrid performance. **Sabrao journal of breeding and genetics**, v.47, n.1, p.21-28, 2015.

SHAKERI, E.; SEYED, A. M. M. S.; DEHAGHI, M. A.; TABATABAEI, S.A.; MEHRDAD MORADI-GHAHDERIJANI. Improvement of yield, yield components and oil quality in sesame (*Sesamum indicum* L.) by N-fixing bacteria fertilizers and urea. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 62, n.4, p.547-560, 2015.

SILVA, W. C. J.; DUARTE, J. B. D. Métodos estatísticos para estudo de adaptabilidade e estabilidade fenotípica em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.1, p.23-30, 2006.

SMITH, C. W., & BETRÁN, J. **Corn: origin, history, technology, and production**, v.4, John Wiley & Sons. 2004.

SMITH, H. F. A discriminant function for plant selection. **Annals of eugenics**, v.7, n.3, p.240-250, 1936.

SOARES, R. J. D. S.; PINTO, A. A.; CAMARA, F. T. D.; SANTANA, L. D. Produtividade de massa verde de milho transgênico em função do arranjo populacional na região do Cariri, CE. **Interações (Campo Grande)**, v.18, n.2, p.117-127, 2017.

SUN, J.; VAN DOMMELEN, A.; VAN IMPE, J.; VANDERLEYDEN, J. Involvement of *glnB*, *glnZ*, and *glnD* genes in the regulation of poly-3-hydroxybutyrate biosynthesis by ammonia in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Applied Environmental Microbiology**, v.68, n.2, p.985-988, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 4ª Ed., p.918, 2013.

USDA. United States Department of Agriculture. World Agricultural Production. **Circular series**. 2018. Disponível em: < <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf> >. Acesso em: 01 dez. 2018.

VASAL S. K.; SINGH N. N.; DHILLON B. S.; PATIL S. J. Population Improvement Strategies for Crop Improvement. In: JAIN H. K.; KHARKWAL M. C. **Plant Breeding: Mendelian to Molecular Approaches**. Springer, Dordrecht, p.812, 2004.

VENCOVSKY, R.; MORAIS, A.R.; GARCIA, J.C.; TEIXEIRA, N.M. Progresso genético em vinte anos de melhoramento do milho no Brasil. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 16., 1986, Belo Horizonte. **Anais**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, p.300-307, 1988.

VIDOTTI, Miriam Suzane. Maize responsiveness to *Azospirillum brasilense*: insights into genetic control and genomic prediction. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, 2018.

WISNIEWSKI-DYÉ, F.; LOZANO, L.; ACOSTA-CRUZ, E.; BORLAND, S.; DROGUE, B.; PRIGENT-COMBARET, C.; MAVINGUI, P. Genome sequence of *Azospirillum brasilense* CBG497 and comparative analyses of *Azospirillum* core and accessory genomes provide insight into niche adaptation. **Genes**, v.3, n.4, p.576-602, 2012.

YAN, W.; HUNT, L. A.; SHENG, Q.; SZLAVNICS, Z. Cultivar evaluation and mega-environment investigation based on the GGE biplot. **Crop Science**, v.40, n.3, p.597-605. 2000.

YAN, W.; TINKER, N. A. Biplot analysis of multi-environment trial data: Principles and applications. **Canadian Journal of Plant Science**, v.86, n.3, p.623-645, 2006.

YANG, J.; CHANG, J.; WANG, Y.; LI, Y.; HU, H.; CHEN, Y.; YAO, J. Comprehensive drought characteristics analysis based on a nonlinear multivariate drought index. **Journal of Hydrology**, v.557, p.651-667, 2018.

YOKOMIZA, G. K.; VELLO, N. A. coeficiente de determinação genotípica e de diversidade genética em topocruzamentos de soja tipo alimento com tipo grão. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.35, n.11, p.2223-2228, 2000.

YOUSEF, Gad G.; JUVIK, John A. Comparison of phenotypic and marker-assisted selection for quantitative traits in sweet corn. **Crop Science**, v.41, n.3, p.645-655, 2001.

ZUCARELI, C.; BAZZO, J. H. B.; SILVA, J. B.; COSTA, D. S.; FONSECA, I. C. B. Doses de nitrogênio e época de cobertura para produção e potencial fisiológico de sementes em milho doce. **Revista Caatinga**, v.31, n.2, p.344-351, 2018.

ZUFFO, A. M.; REZENDE, P. M.; BRUZI, A. T.; OLIVEIRA, N. T.; SOARES, I. O.; NETO, G. F. G.; CARDILLO, B. E. S.; SILVA, L. O. Co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* in the soybean crop. **Revista de Ciências Agrárias**,

v.38 n.1, p.87-93, 2015.

ZUMFT, W. G. Regulation of nitrogenase activity in anoxygenic phototrophic bacteria. In: EVANS, H. J.; BOTTOMLEY, P. J.; NEWTON, W. E., (Ed.). **Nitrogen fixation research progress**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. p.551-557, 1985.

CAPÍTULO I

DESEMPENHO AGRONÔMICO DE GENÓTIPOS DE MILHO SOB DEFICIÊNCIA DE NITROGÊNIO INOCULADOS COM *Azospirillum brasiliense*.

RESUMO

CECCON, Felipe. **Desempenho agronômico de genótipos de milho sob deficiência de nitrogênio inoculados com *Azospirillum brasiliense***. 2019. 28 f. Orientador: Dr. Manoel Carlos Gonçalves.

O milho é uma cultura exigente em nitrogênio, nutriente comumente disponibilizado na forma mineral. Inoculação de bactérias fixadoras desse nutriente em sementes de milho é uma forma de fornecer o nutriente, diminuir os custos com fertilizantes e reduzir impactos ambientais. O uso de bactérias da espécie *A. brasiliense* tem como objetivo a fixação biológica do N atmosférico e liberação de precusores de fitormônios que auxiliam no crescimento da planta. Genótipos de milho respondem de forma diferente na presença da bactéria, tornando importante o uso da cultivar mais responsiva ou com maior capacidade de interação quando inoculada com a bactéria. Assim sendo, o objetivo do estudo foi avaliar o desempenho agronômico de genótipos de milho sob influência da bactéria *Azospirillum brasiliense* e sua relação em ambientes com restrição de nitrogênio. O delineamento foi o látice simples 16x16 com 256 genótipos. Os mesmos foram testados em quatro ambientes de avaliação; com e sem a inoculação de bactérias da espécie *A. brasiliense* em dois municípios. Foram avaliadas altura de planta, comprimento de espiga, diâmetro de colmo, intervalo de florescimento, massa de cem grãos, nota de sanidade e produtividade. Os efeitos da inoculação, dos genótipos e dos locais foram significativos nas variáveis avaliadas. A inoculação foi eficiente em 14% dos genótipos avaliados indiferentes do local de avaliação. 37 progênies foram classificadas como produtivas e de eficiente interação com a bactéria, sendo que 83% delas têm um híbrido simples como genitor feminino. A resposta do milho ao uso de *Azospirillum brasiliense* é dependente do genótipo e do ambiente e que se inocula. Os genótipos podem aumentar, diminuir ou manter a produtividade quando inoculados em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio. A opção de inocular o milho com *Azospirillum* deve ser considerada quando o genótipo apresenta eficiente associação com a mesma.

Palavras-chave: Fixação biológica, Eficiência no uso do nitrogênio, Microbiota da rizosfera.

CHAPTER I

AGRONOMICAL PERFORMANCE OF MAIZE GENOTYPE UNDER NITROGEN DEFICIT INOCULATED WITH *Azospirillum brasiliense*.

ABSTRACT

CECCON, Felipe. **Agronomical performance of maize genotype under nitrogen deficit inoculated with *Azospirillum brasiliense***. 2019. 28 p. Advisor: Dr. Manoel Carlos Gonçalves.

Corn is a crop which demands nitrogen, a nutrient that is commonly made available in mineral form. Inoculation of nutrient-fixing bacteria in corn seeds is a way to provide nutrients, reduce fertilizer costs, and reduce environmental impacts. The use of bacteria of the specie *A. brasiliense* aims at the biological fixation of atmospheric N and release of precursors of phytohormones that help plant growth development. Maize genotypes respond in a varied way in the presence of bacteria, making important the use of the best responsive genotype or one with greater capacity of interaction when inoculated with the bacteria. Therefore, the objective of this study was to evaluate the agronomic performance of maize genotypes under the influence of the *Azospirillum brasiliense* bacteria and its relation in environments with nitrogen restriction. The design was the simple 16x16 lattice with 256 genotypes. They were tested in four sites; with and without the inoculation of *A. brasiliense* bacteria in two cities. Plant height, ear length, stalk diameter, flowering interval, one hundred grain mass, sanity grade and yield in all plots were evaluated. The effects of inoculation, genotypes and sites were significant in the evaluated characteristics. The inoculation was efficient in 14% of the evaluated genotypes indifferent to the site. 37 progenies were classified as productive and of efficient interaction with the bacteria, with 83% of them having a simple hybrid as a female genitor in common. The response of maize to the use of *Azospirillum brasiliense* depends on the genotype and the environment which is inoculated. Genotypes may increase, decrease or maintain yield when inoculated in conditions of low nitrogen availability. The option of inoculating corn with *Azospirillum* should be when the genotype is associated with it.

Keywords: Biological fixation, Nitrogen use efficiency, Rhizosphere microbiota.

1. INTRODUÇÃO

O milho é o segundo grão mais produzido no território nacional, podendo ser cultivado na safra de verão e inverno. A produtividade brasileira do cereal foi menor que a média mundial em 2018 (USDA, 2018), o que torna importante o estudo de causas dessa baixa produtividade.

O Brasil é um país de clima predominantemente tropical, com condições de luminosidade, temperatura e pluviosidade adequadas para a produção de milho em boa parte de seu território. Tais condições aumentam o consumo de nitrogênio, o qual é maior durante o estágio vegetativo da planta em relação ao estágio reprodutivo, tornando o nutriente mais importante no início do seu desenvolvimento para a garantia de uma boa arquitetura de planta (LONGHINI et al., 2016).

A inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio é muito utilizada em outras culturas, como a mandioca (HRIDYA et al., 2012), o gergelim (SHAKERI et al., 2015) e a soja (BRUM et al., 2018), sendo que a interação nessa última pode providenciar até 100% do nitrogênio necessário para o desenvolvimento de planta (MENDES, HUNGRIA & VARGAS, 2003). Uma dessas bactérias fixadoras de nitrogênio muito utilizada na inoculação de sementes de milho é a *Azospirillum brasiliense*. Elas são endofíticas facultativas, ou seja, sua interação com as raízes pode ser na rizosfera da raiz ou no interior do tecido radicular (HUNGRIA et al., 2010).

O uso de inoculantes com organismos fixadores de nitrogênio tem importante papel ecológico. O processo de redução do N_2 à amônia mediado pelos organismos não requer queima de combustíveis fósseis como no processo industrial (KERBAUY, 2004). Sem contar que a adição de fertilizantes sintéticos na forma amoniacal está sujeita a perdas por lixiviação de NO_3^- e volatilização de N_2O , e essas formas oxidadas de nitrogênio podem contaminar águas subsuperficiais (KENNEDY et al., 2004).

Além de disponibilizar o nitrogênio para a planta (VINHAL-FREITAS & RODRIGUES, 2010), as bactérias liberam precursores de hormônios de crescimento, o que

altera a fisiologia, metabolismo e a produtividade da planta (BAR & OKON, 1993). De Quadros et al. (2014) sugerem que híbridos de milho respondem de maneira diferente à inoculação com *A. brasiliense*. Nesse contexto, a escolha correta do genótipo de milho a se utilizar com a bactéria, é de grande importância.

A agricultura no Brasil importa a maioria dos fertilizantes químicos utilizados nos cultivos, o que envolve a segurança nacional uma vez que o Brasil não seria autossustentável na produção de grãos sem esses fertilizantes (CONAB, 2017; GUARESCHI et al., 2019). A fixação biológica do nitrogênio pode diminuir esses problemas do uso de fertilizantes industriais, desde que a associação entre a bactéria e a planta seja eficiente.

A prática da inoculação é uma forma sustentável de disponibilizar o nutriente à planta uma vez que o processo de fabricação industrial da amônia requer combustão de fontes não renováveis. Nesse contexto, o objetivo do estudo foi avaliar o desempenho agrônômico de genótipos de milho sob influência da bactéria *Azospirillum brasiliense* em ambientes com restrição de nitrogênio.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condições experimentais e caracterização dos genótipos

Os experimentos foram realizados em dois locais, na Fazenda Experimental de Ciências Agrárias (FAECA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), em Dourados, Mato Grosso do Sul (MS), com localização de 22° 11' 55" S, 54° 56' 07" O, altitude de 452 m e no sitio São José, em Caarapó, MS, de coordenadas 22°33'07,3"S, 54°50'01,3" O, altitude de 411m. O clima dos municípios citados, segundo a classificação de Köppen é do tipo Cwa, com verões quentes e invernos secos, temperaturas máximas durante os meses de dezembro e janeiro e as temperaturas mínimas entre maio e agosto. As informações sobre os atributos químicos do solo se encontram no quadro 1.

Quadro 1. Atributos químicos e teor de argila de amostras de solo das profundidades de 0-20 e 20-40 cm nos nas áreas experimentais em Dourados e Caarapó.

	Dourados		Caarapó	
	0 - 20	20 - 40	0 - 20	20 - 40
pH (CaCl ₂)	5,40	4,80	5,85	5,55
MO (g dm ³)	21,00	20,80	5,70	5,35
P (mg dm ³)	17,00	14,00	76,37	70,96
K (cmol dm ³)	0,33	0,35	0,27	0,32
Al (cmol dm ³)	0,00	0,00	0,00	0,00
Ca (cmol dm ³)	3,90	3,90	3,25	3,00
Mg (cmol dm ³)	2,10	2,00	1,07	0,94
H+Al (cmol dm ³)	3,70	3,80	3,13	3,80
SB (cmol dm ³)	6,20	6,20	6,17	5,22
V (%)	63,00	62,00	59,40	52,90
Teor de Argila (%)	59,70	53,80	21,40	20,20

As sementeiras foram realizadas no dia 9 de março em Dourados e 21 de março em Caarapó. No dia anterior à sementeira de Dourados, o solo foi preparado com subsolador

com haste de 30 cm e uma grade aradora. A adubação foi realizada no sulco de semeadura com semeadora, regulada para distribuir 200 kg ha⁻¹ do adubo 8-20-18 (25 kg de N), segundo análise de solo e exigências da cultura (SOUZA & LOBATO, 2004).

Em Caarapó, o milho foi cultivado em semeadura direta após cultivo de soja e a propriedade estava no quinto ano sem revolvimento do solo. A adubação foi feita na linha de semeadura, com 150 kg ha⁻¹ da fórmula 11-31-17 + 90 kg ha⁻¹ de KCl distribuídos à lanço (22 Kg de N). Em Dourados o solo foi mantido em pousio antes da implantação dos experimentos. Nos dois locais, a adubação de cobertura foi realizada 30 dias após a emergência (DAE) adicionando 15 kg ha⁻¹ de Ureia (45% N) ao lado da linha de semeadura (7 Kg de N).

Em soma, foram disponibilizados 32 e 29 kg de N respectivamente nos experimentos em Dourados e Caarapó, o que segundo uma média de 25 ensaios apresentada por Raij (1991) permite atingir produtividades de até 4.500 kg ha⁻¹. Essa sub dose do nutriente foi imposta pelo fato de que a enzima nitrogenase diminui sua atividade metabólica na presença de amônio, fazendo com que as bactérias acumulem compostos energéticos em detrimento de quebrar moléculas de N₂ ocasionando na fixação nitrogênio (SUN et al., 2002).

Em Dourados, com 30 DAE, foram realizadas pulverizações de 28 g ha⁻¹ de Tiametoxan + 21 g ha⁻¹ de Lambda-cialotrina. Com 50 DAE foram aplicados 100 g ha⁻¹ de imidacloprido, com 15 g ha⁻¹ de Teflubenzurom e 1 kg ha⁻¹ de atrazina. Em Caarapó, aos 30 DAE foram aplicados 86 g ha⁻¹ de metomil, aos 45 foram 40 g ha⁻¹ de bifentrina com 62 g ha⁻¹ de azoxistrobina com 62 g ha⁻¹ de flutriafol e aos 57 DAE foram aplicados 20 g ha⁻¹ de clorantraniliprole com 2 kg ha⁻¹ de atrazina. Aos 40 e aos 60 DAE foi aplicado 1 L ha⁻¹ de um fertilizante líquido (12g de Carbono Orgânico, 50g de N, 12g de P₂O₅, 12g de Ca, 12g de Mg, 23g de S, 4g de Bo, 37g de Mn, 1g de Mo, 12g de Zinco e 1g de Ni).

As condições climatológicas durante o período de condução dos experimentos foram mensuradas pelas estações meteorológicas automáticas da EMBRAPA (Figuras 1 e 2)

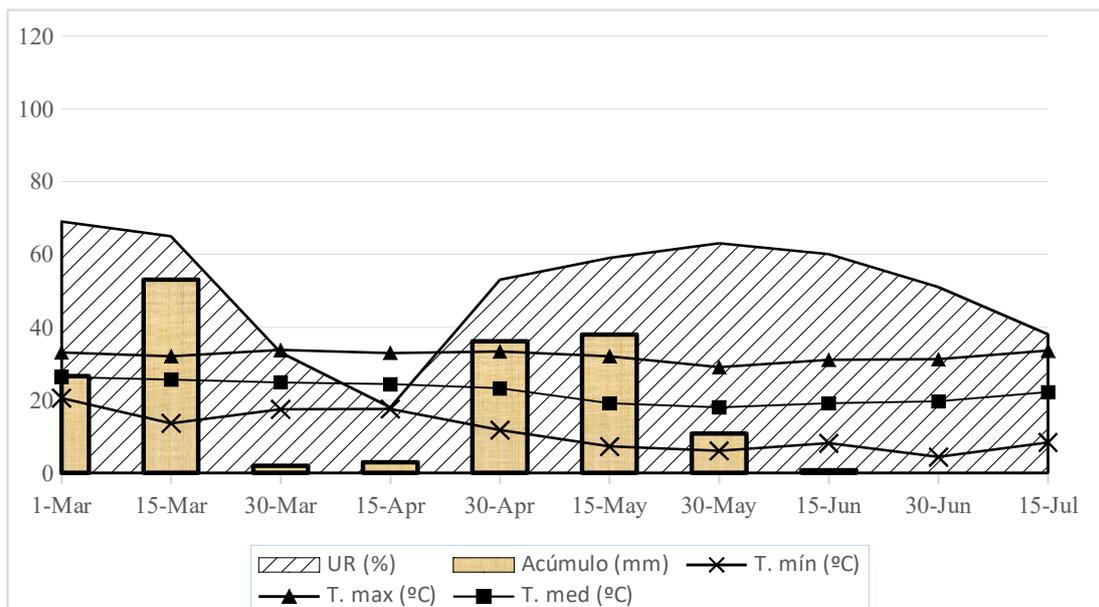


Figura 1. Dados quinzenais de umidade relativa (UR), pluviosidade (acúmulo em mm), temperatura mínima, temperatura máxima e temperatura média (em °C) da região de Dourados nos meses de março a julho de 2018 (INMET, 2018).

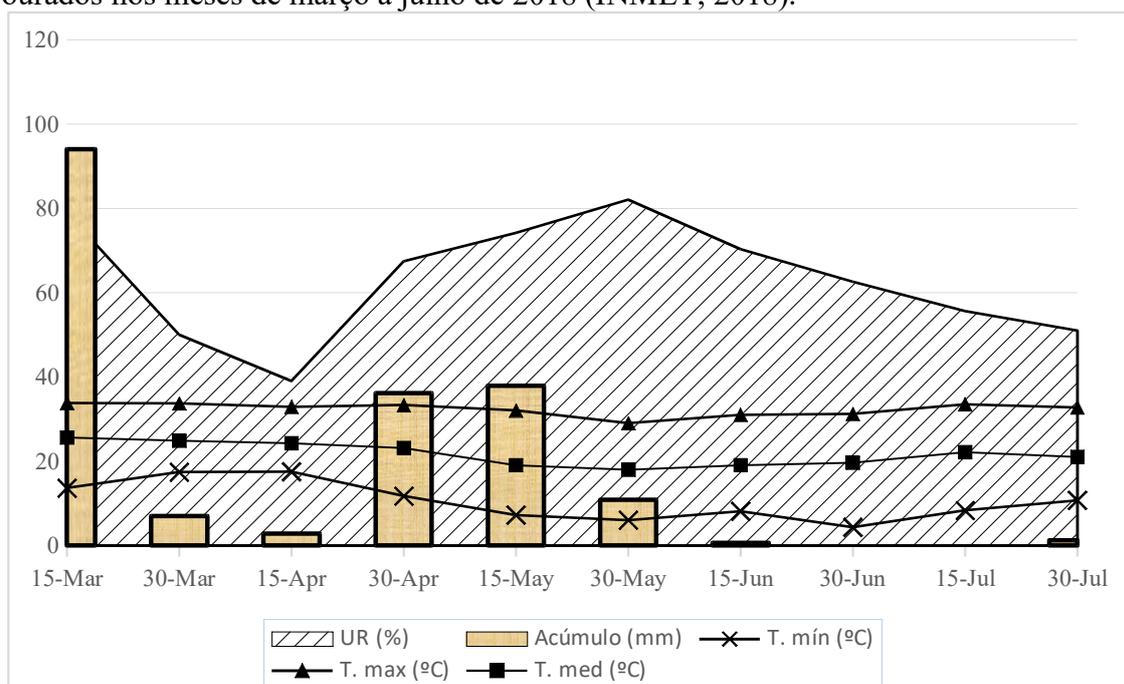


Figura 2. Dados quinzenais de umidade relativa (UR), pluviosidade (acúmulo em mm), temperatura mínima, temperatura máxima e temperatura média (em °C) da região de Caarapó nos meses de março a julho de 2018 (EMBRAPA, 2018).

Foram avaliados 256 genótipos, sendo 250 progênies de meio irmão (PMI), cinco cultivares progenitores dessas 250 PMI e uma cultivar adaptada a região adicionada ao delineamento como um genótipo testador. Para a obtenção das progênies, essas cinco cultivares (três variedades de polinização aberta e dois híbridos simples) foram semeadas na safra 2017/2018 em campo isolado para evitar contaminação por pólen exógeno. Foram

selecionadas 50 espigas de cada cultivar, as quais foram debulhadas e passadas por tratamento de semente para serem avaliadas.

O delineamento experimental utilizado nessa avaliação foi o látice simples 16x16 devido ao elevado número de genótipos. Cada unidade experimental consistiu de uma linha de 3,30 m, espaçada em 0,33 m entre plantas e 0,45 m entre linhas. Foram semeadas duas sementes por cova e, aos 21 dias após emergência (DAE), foi realizado o desbaste das covas em que as duas sementes germinaram, deixando uma planta por cova, resultando em estande de 10 plantas por parcela representando população de aproximadamente 74 mil plantas ha⁻¹.

2.2 Tratamentos e características avaliadas

Os genótipos foram submetidos a presença e ausência da inoculação com bactérias da espécie *Azospirillum brasiliense*. A inoculação foi feita quatro horas antes da semeadura utilizando a dose de 150 mL ha⁻¹ recomendada pelo fabricante do produto (garantia de concentração mínima: 2,0 x 10⁸ células viáveis mL⁻¹).

Para verificação do desempenho dos genótipos foram avaliadas as seguintes variáveis: i) altura de planta (AP): média de cinco plantas centrais na parcela mensurada, em metros, do colo da planta até a inserção do pendão; ii) comprimento de espiga (CE): média de cinco espigas aleatórias mensurada, em cm, da base à ponta das espigas; iii) diâmetro de colmo (DC): média de cinco plantas do centro da parcela avaliada, em cm e com um paquímetro, a um metro de altura do solo no meio do entrenó; iv) intervalo de florescimento (IF): diferença de dias entre o florescimento masculino e florescimento feminino de todas as plantas na parcela; v) nota de sanidade (S): valor atribuído visualmente durante o florescimento variando de 1 a 5, onde 1 é uma parcela com 80 a 100% das folhas com sintomas de ataque por pragas ou doenças, 2 é uma parcela com 60 a 80% das folhas com sintomas de ataque, 3 é uma parcela com 40 a 60% das folhas com sintomas de ataque, 4 é uma parcela com 20 a 40% das folhas com sintomas de ataque e 5 é uma parcela com 0 a 20% das folhas danificadas; vi) massa de mil grãos (MCG): massa de cem grãos de cada parcela, em gramas, e corrigida para 13% de umidade no grão; e vii) produtividade de grãos (PROD): obtida por meio do peso de grãos de todas as plantas da parcela, para 13% de umidade e extrapolado por regra de três para kg ha⁻¹.

2.3 Análises estatísticas

Antes da análise de variância (Anova), foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar a homogeneidade da variância residual. Posteriormente, a Anova foi realizada considerando os efeitos de genótipos, locais e inoculação, com o objetivo de determinar possível significância na interação de genótipos de milho com a bactéria *Azospirillum brasiliense*.

Como forma de certificar a qualidade das médias fenotípicas, foi estimada acurácia seletiva (DE RESENDE & DUARTE, 2007), por sumarizar o coeficiente de variação experimental, o número de repetições e o coeficiente de variação genotípica numa única estatística. O parâmetro é calculado pela equação:

$$AS = \left(1 - \frac{1}{F}\right)^{1/2} (1)$$

Em que F é o valor do teste de F para as progênies na análise de variância.

A análise da variância (Tabela 1) foi realizada pelo método dos quadrados mínimos, de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijkml} = \mu + (b/r Ab || L)_{ijkml} + \epsilon$$

Nesse modelo, Y_{ijkml} é a observação do i-ésimo genótipo ($i = 1, 2, \dots, 256$), no j-ésimo bloco ($j = 1, 2, \dots, 16$), na k-ésima repetição ($k = 1, 2$), com o m-ésimo tratamento de inoculação ($m = 1, 2$) e no l-ésimo local ($l = 1, 2$);

μ é a constante geral;

$(b/r Ab || L)_{ijkml}$ é o efeito fixo do j-ésimo bloco, dentro da k-ésima repetição, com o m-ésimo tratamento de inoculação no l-ésimo local;

ϵ é o efeito fixo da k-ésima repetição com o m-ésimo tratamento no l-ésimo local;

G_i é o efeito fixo do i-ésimo genótipo;

Ab_m é o efeito fixo do m-ésimo tratamento de *Azospirillum brasiliense*;

$G * Ab_m$ é o efeito fixo da interação entre o i-ésimo genótipo com o m-ésimo tratamento de *Azospirillum brasiliense*;

L_l é o efeito fixo do l-ésimo local;

$G * L_l$ é o efeito fixo da interação do i-ésimo genótipo com o l-ésimo local l;

$Ab * L_l$ é o efeito fixo da interação do m-ésimo tratamento de *Azospirillum brasiliense* com o l-ésimo local;

$G * Ab * L_{ilm}$ é o efeito fixo da interação do i-ésimo genótipo, com o m-ésimo

tratamento de *Azospirillum brasiliense* e o l-ésimo local;

ε_{ijklm} é o erro aleatório experimental médio associado à observação Y_{ijklm} com NID $(0, \sigma^2)$.

Para comparar a produtividade com a eficiência de simbiose com a bactéria, os genótipos foram representados em um plano cartesiano por meio da relação entre a produtividade com e sem *A. brasiliense*. Os mesmos foram classificados em quatro categorias em cada local de avaliação (FURLANI et al., 2002):

I: produtivos e não-responsivos (PNR): são os que apresentaram produtividade acima da média do tratamento sem inoculação da bactéria, porém respondem de maneira negativa na presença da bactéria;

II: produtivos e responsivos (PR): são os que apresentaram produtividade acima da média do tratamento controle enquanto responderam positivamente à inoculação;

III: não-produtivos e responsivos (NPR): são os que apresentaram produtividade menor que a média do experimento sem inoculação, entretanto respondem positivamente à mesma;

IV: não-produtivos e não-responsivos (NPNR): são os que apresentaram produtividade menor que a média do experimento controle e não respondem à presença da bactéria.

Para testar a hipótese de que o efeito da bactéria pode auxiliar no acúmulo de nitrogênio no grão, foram selecionadas 20 das progênies com maior eficiência de associação com *A. brasiliense* e 20 com menor eficiência para quantificação do conteúdo de nitrogênio nos grãos.

As amostras de grãos foram trituradas e peneiradas para a quantificação de nitrogênio. O método utilizado para a diluição do nitrogênio nas amostras foi o de Kjeldahl descrito por (SILVA et al., 2016b). O delineamento utilizado para a análise de variância foi um fatorial entre dois tipos de resposta e 20 genótipos em blocos ao acaso com três repetições. Foi feito teste de Shapiro-Wilk de normalidade dos resíduos e de Tukey para comparação das médias de teor de nitrogênio no grão.

Os testes de normalidade, os cálculos de análise de variância e a projeção dos gráficos foram realizadas utilizando o aplicativo computacional R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2018).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito fixo de Local (L) foi significativo ($p < 0,01$) para todas as variáveis analisadas (Tabela 1), podendo inferir-se que os locais (Dourados e Caarapó) são divergentes e podem conferir uma seleção mais fidedigna das progênes. O efeito fixo dos genótipos e de seus desdobramentos em progênes e genitores foram significativos ($p < 0,01$), indicando que existe variação genotípica (Φ_G) entre eles para os parâmetros avaliados. Variação genotípica em populações contribuiu para o aumento da frequência indivíduos superiores, permitindo a seleção de progênes de interesse no presente estudo.

O delineamento látice simples é caracterizado por haverem duas repetições, o que pode ser inadequado para se fazer inferências sobre a qualidade do ensaio (DE RESENDE & DUARTE, 2007). Para calcular a qualidade experimental, a acurácia seletiva resumiu as informações de variação experimental e genética para que possam ser feitas inferências a partir das médias fenotípicas das variáveis. Os valores foram maiores que 0,9 para seis das sete variáveis avaliadas no experimento, indicando precisão na mensuração destas variáveis.

A interação Local x *A. brasiliense* (L x Ab) foi significativa ($p < 0,01$) para as variáveis avaliadas, significando que a diferença na expressão das mesmas foi alterada pela presença da bactéria em intensidades diferentes nos locais de avaliação. Uma revisão bibliográfica do século passado sobre a bactéria (BASHAN, 1999) já mostrava que 60% dos solos tropicais continham células de estirpes do gênero *A. brasiliense*, as quais podiam estar dormentes e se ativar fisiologicamente na presença de um hospedeiro. Solos de textura arenosa foram os que apresentaram maior quantidade de isolados da bactéria, podendo explicar a diferença significativa entre locais e a bactéria no presente estudo.

Segundo a teoria do nicho (HUTCHINSON, 1957), fatores ambientais abióticos

influenciam diretamente no funcionamento das bactérias, os quais estimulam respostas fisiológicas nas mesmas indicando se o ambiente é habitável ou não. A matéria orgânica, por ser fonte de carbono às bactérias (FORTE & GARCIA, 2018), é um exemplo de fator abiótico que influencia significativamente a densidade populacional das mesmas no solo (CERRÓN & YUPANQUI, 2017; COSTA-PEREIRA et al., 2018). A diferença média de 15,4 g dm³ entre os solos dos locais pode ser importante para a compreensão do efeito significativo da interação L x Ab.

Tabela 1. Análise da variância dos efeitos de 256 genótipos de milho sob dois níveis de inoculação com bactérias da espécie *Azospirillum brasiliense* em Dourados e Caarapó, na segunda safra de 2018.

Fonte Variação	GL	Quadrados Médios						
		AP	CE	DC	IF	MCG	NS	PROD
Blo/Rep/Az/L	120	0,01ns	0,03ns	0,02ns	0,30ns	25,02ns	0,07ns	10.275,03ns
Rep/Az/L	4	0,01ns	1,43**	0,01**	5,75**	610,25**	0,20*	181.592,00**
<i>A. brasiliense</i> (Ab)	1	1,02**	30,76**	3,30**	341,3**	35.159,01**	445,34*	21.965.596,00**
Local (L)	1	38,65**	296,12**	19,38**	448,1**	243.286,02**	79,33**	203.597.200,00**
L*Ab	1	0,07**	29,77**	2,45**	168,8**	4.552,02**	230,51**	2.329.096,00**
Genótipo (G)	255	0,02**	7,31**	0,01**	3,05**	4.928,01**	0,53**	2.615.078,00**
Progênie (Pro)	249	0,02**	7,3**	0,01**	3,12**	4.998,03**	0,52**	2.561.458,00**
Genitor (Gen)	5	0,05**	8,31**	0,01**	2,83**	2.113,01**	0,68**	4.768.358,01**
L*G	255	0,03**	5,32**	0,01**	3,20**	1.780,01**	0,13*	1.990.462,03**
Pro*L	249	0,03**	5,41**	0,01**	3,21**	1.816,02**	0,21**	2.015.230,00**
Gen*L	5	0,02**	1401**	0,01**	0,77ns	310,05**	0,08ns	1.075.924,04**
Ab*G	255	0,01**	0,45**	0,02**	2,91**	103,04**	0,30**	127.304,03**
Ab*Pro	249	0,01**	0,4**	0,02**	3,23**	67,64**	0,31**	82.273,02**
Ab*Gen	5	0,06**	3,14**	0,02**	1,97**	1.902,07**	0,28*	2.348.268,02**
L*Ab*G	255	0,01**	0,46**	0,02**	2,41**	125,61**	0,43**	131.934,01**
Pro*Ab*L	249	0,01**	0,47**	0,02**	2,43**	125,04**	0,42**	131.418,03**
Gen*Ab*L	5	0,05**	0,18**	0,06**	0,97*	188,21**	0,35*	183.171,02**
Resíduo	900	0,02	0,03	0,02	0,3	23,01	0,03	9.666,10
Média	-	1,90	13,66	2,17	2,17	269,54	3,69	2681,72
Acurácia	-	0,99	0,93	0,98	0,96	0,98	0,84	0,99

AP: altura de plantas (em metros); CE: comprimento de espiga (em cm); DC:: diâmetro de colmo (em m); IF: intervalo de florescimento (em dias); MCG: massa de cem grãos (em g); NS: nota de sanidade; PROD: produtividade (em kg ha⁻¹ corrigida para 13% de umidade no grão); **: significativo à 1% e 5%, respectivamente, pelo teste de F.

As interações L x Pro foram significativas ($p < 0,01$), assim as diferenças entre os locais de avaliação influenciaram o desempenho das progênies. De maneira análoga, as interações Ab x Pro e Ab x Gen também foram significativas para as variáveis analisadas ($p < 0,01$), implicando que a bactéria influenciou no desempenho desses genótipos. Um estudo referência que avaliou a atividade da enzima nitrogenase, conteúdo de N foliar e produtividade em genótipos de milho argentinos e brasileiros (DÖBEREINER et al., 1996) também encontrou que genótipos de milho respondem de maneira variada à inoculação e ao ambiente. Os autores frisam que o nitrogênio tem grande influência na interação genótipo-*Azospitillum spp.*, evidenciando que a restrição de nitrogênio pode ter colaborado para os efeitos significativos.

A interação L x Gen não foi significativa para as variáveis IF e NS, o que permite interpretação de que os efeitos dos locais não interferiram significativamente no ciclo e na sanidade dos genitores. Essa observação permite inferir que esses seis genótipos foram estáveis às mudanças ambientais (De CARVALHO et al., 2002) pois as diferenças observadas não foram significativas nos genitores testados. Esses genitores são cultivares estabelecidas no mercado que já passaram por ensaios de VCU e provaram sua estabilidade em diferentes locais e anos, a não interferência dos efeitos do ambiente na expressão fenotípica desses genótipos pode estar associada a estabilidade genética dos mesmos (TOLLENAAR & LEE, 2002).

O efeito significativo de (Ab) pode ter ocorrido em função da diferença de textura e manejo do solo nas propriedades. O desempenho da bactéria é fortemente influenciado pelas condições ambientais; temperatura, competição com organismos nativos, disponibilidade de água e ar no solo (HUNGRIA et al., 2010). O plantio direto e convencional respectivamente em Caarapó e Dourados e os teores médios de argila de 20,8% e 56,7% em Caarapó e Dourados (Quadro 1) são aspectos importantes para compreender essa significância do efeito fixo das bactérias tanto quanto sua interação em cada local (L x Ab).

A média de produtividade do estudo foi de 2.681 kg ha⁻¹ (Tabela 1), valor baixo quando comparado com a média nacional de 5.500 kg ha⁻¹ (CONAB, 2018). Isso pode ter ocorrido, além da restrição de nitrogênio imposta no estudo, pela semeadura tardia dos genótipos e pelo genótipo do tipo progênie de meio-irmão. O preparo tardio da área se deu em função da logística das instituições onde os experimentos foram implantados, o que condicionou temperaturas mais baixas, menor disponibilidade de águas e dias mais curtos,

condições que podem reduzir a produção de milho por unidade de área (NEUMANN et al., 2016). Sem contar que a média nacional foi obtida 87% de genótipos tipo híbrido, os quais têm maior capacidade genética de produção devido ao efeito da heterose (ABERA et al., 2016).

Os genótipos foram representados em planos cartesianos por meio da relação entre a produtividade de grãos com e sem *A. brasiliense* (Figuras 3 e 4). A linha que corta o gráfico na diagonal representa o limite entre eficiência de produtividade e de responsividade à bactéria. Genótipos situados acima da linha são mais produtivos do que eficientes em associar-se com a bactéria, enquanto os localizados abaixo da linha apresentam maior simbiose com a bactéria (associação mais eficiente). A linha vertical em cada figura representa a média de todos genótipos no tratamento inoculado, enquanto a horizontal representa a média dos mesmos na ausência do tratamento com a bactéria fixadora.

O ambiente de Caarapó apresentou 81% dos genótipos abaixo da linha diagonal (Figura 4), enquanto Dourados apresentou 73% (Figura 3). Na avaliação em Dourados, 26% dos genótipos apresentaram produtividade menor quando inoculados. Em Caarapó, 18% apresentaram tal desempenho.

O sistema de plantio sem revolvimento de solo em Caarapó, comparado com o revolvimento de solos em Dourados, pode ter sido um fator que colaborou para o maior percentual de genótipos de eficiente simbiose. O revolvimento do solo expõe os ambientes onde os microrganismos estavam estabelecidos no solo, além de alterar a temperatura, aeração e porosidade do sistema (JANUŠAUSKAITE et al., 2013). A alteração na composição da comunidade de microrganismos pode influenciar as taxas de decomposição da matéria orgânica, influenciando na disponibilidade de nutrientes (FREY et al., 1999).

Se tratando da disponibilidade de nutrientes, um estudo de 30 anos de avaliação da microbiologia de solo cultivado com milho (ZHAO et al., 2016) mostrou que o acúmulo de MO, em sistema sem revolvimento da palhada no solo, afeta significativamente a estrutura da comunidade de bactéria no solo e atividade de enzimas. Outros trabalhos mostraram que o não revolvimento do solo aumenta o teor de matéria orgânica em profundidade ao longo dos anos (CRITTENDEN et al.; LAUDICINA et al., 2015). Com isso, Caarapó pode ter propiciado condições para que um maior número de genótipos se associasse de maneira favorável à bactéria (comparação do número de genótipos abaixo da linha diagonal entre as Figuras 3 e 4), entretanto o efeito dessa simbiose não foi tão forte como em Dourados, quando se observa as letras do teste de médias na Tabela 2.

Para a seleção de genótipos eficientes na associação com *A. brasiliense* é interessante selecionar os que apresentaram incremento em produtividade na presença dessa bactéria e de preferência nos dois locais. Nesse contexto, 137 genótipos avaliados em Dourados foram alocados no quadrante II, ou seja, apresentaram produtividade acima da média e aumento da mesma quando inoculados. Enquanto 84 deles receberam mesma classificação em Caarapó. No total, 40 genótipos permaneceram no quadrante II quando observados nos dois locais, sendo 37 progênies, dois genitores (253 e 255) e o 256, híbrido simples adicionado no delineamento para comparar os genótipos.

Essas 37 progênies são consideradas progênies de interesse para presente estudo. Dentre elas, 16,2% tem como parental feminino uma variedade de polinização aberta enquanto os 83,8% restantes têm um híbrido simples como genitor materno, o genótipo 255 do delineamento. Dentre os genitores, esse foi o que mais contribuiu para a expressão de progênies produtivas e responsivas.

O genótipo parental 252, uma variedade de polinização aberta e progenitor das progênies de número 51 a 100, teve sua produtividade diminuída nos dois locais quando inoculado com *A. brasiliense*. Sua posição nas Figuras 3 e 4 sugere que sua produtividade foi acima da média dos genótipos sem inoculação e abaixo quando inoculado. O *Azospirillum* tem a capacidade de produzir fitormônios capazes de influenciar no metabolismo das plantas e interferir na sua resposta às condições abióticas (CASSAN & DÍAS-ZORNITA, 2016), o que pode ter colaborado para que a inoculação no genótipo 252 não tenha sido satisfatória para a produtividade de grãos desse genótipo.

Observando as medias de produtividade das progênies desse genótipo nas Figuras 3 e 4, 65% delas apresentaram decréscimo de produtividade na presença da bactéria. O genótipo 62 deixou de produzir, em média, 12 gramas por planta na colheita quando comparado ao tratamento sem inoculação de *A. brasiliense* na semeadura. Diante tal desempenho, uma discussão sobre a especificidade de genótipos de milho e estirpes da espécie *Azospirillum brasiliense* pode ser levantada no presente estudo.

A exsudação de moléculas oriunda da raiz da planta, a microbiota nativa do ambiente e condições abióticas do solo são fatores que influenciam na seleção e atração da biomassa microbiana (MOMMER et al., 2016). Outros autores já relataram que a resistência de plantas à patogênese é dependente da composição da microbiota da rizosfera (MENDES et al., 2014).

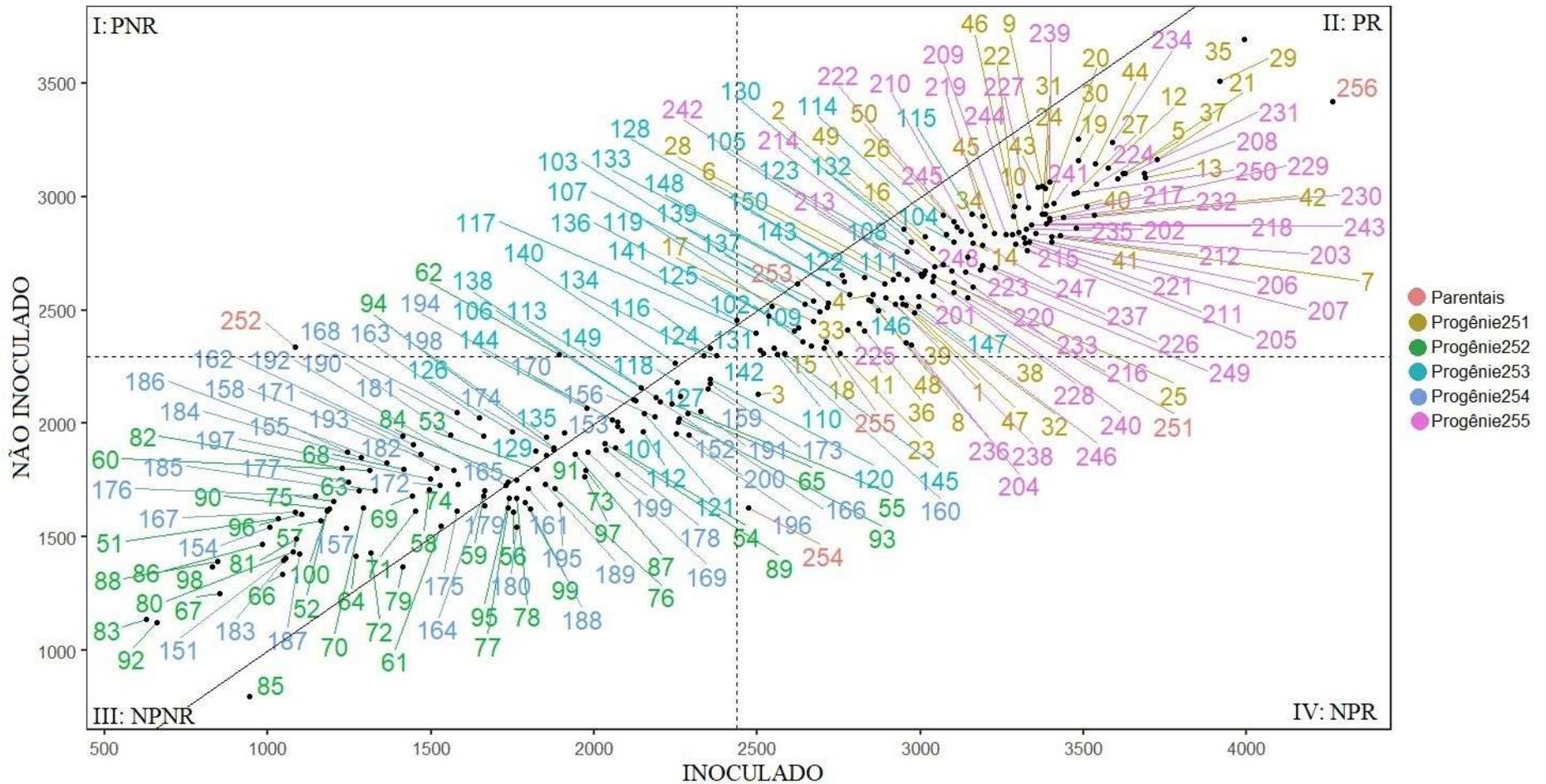


Figura 3. Performance de 256 genótipos de milho em relação à eficiência de produtividade e responsividade à *A. brasiliense* avaliados na segunda safra de 2018 em Dourados. PNR: produtivos e não-responsivos; PR: produtivos e responsivos; NPR: não-produtivos e responsivos; NPNR: não-produtivos e não-responsivos

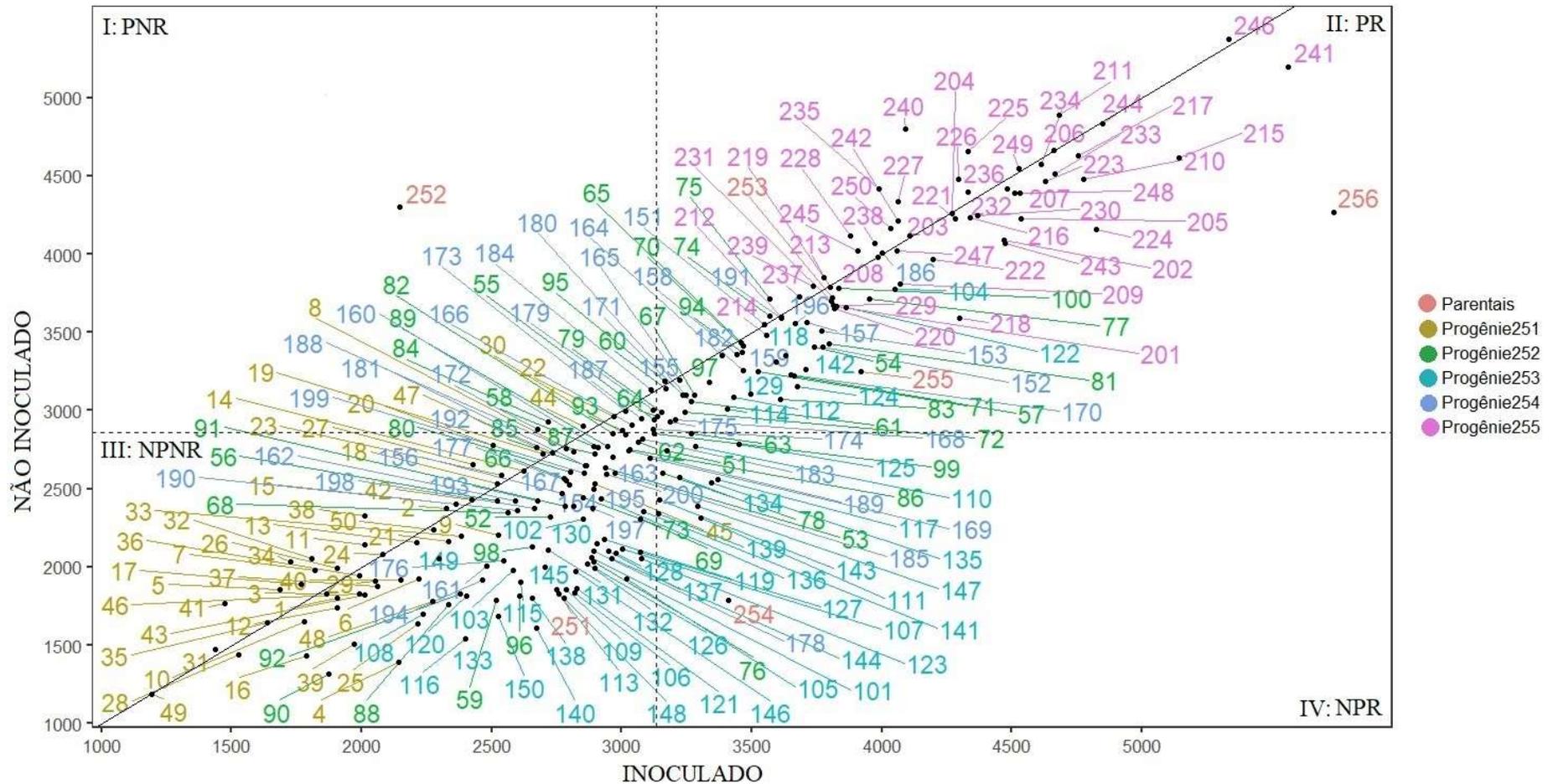


Figura 4. Performance de 256 genótipos de milho em relação à eficiência de produtividade e responsividade à *A. brasiliense* avaliados na segunda safra de 2018 em Caarapó. PNR: produtivos e não-responsivos; PR: produtivos e responsivos; NPR: não-produtivos e responsivos; NPNR: não-produtivos e não-responsivos.

O genótipo 252 e algumas de suas progênes tiveram produtividade diminuída na presença da inoculação, enquanto o genótipo 255 e algumas de suas progênes, apresentaram resultados sinérgicos quando inoculado com a bactéria *A. brasiliense* (Figuras 3 e 4). De modo a

fortalecer a discussão sobre a especificidade, os genótipos podem ter alterado a composição do microbioma na sua rizosfera com o uso da inoculação, alterando conseqüentemente suas resistências e influenciando nos desempenhos.

As variáveis estudadas foram influenciadas pelo uso das bactérias, as quais além de disponibilizar nitrogênio por meio da fixação biológica auxiliaram na redução de estresses abióticos, pelo fato desses organismos serem capazes de influenciar na expressão de genes na planta (CURÁ et al., 2017). Essa observação, juntamente com a interação significativa de G x Ab, podem explicar o desempenho positivo e negativo das progênes na presença da bactéria (Figuras 3 e 4) bem como as alterações nas médias dos parâmetros avaliados (Tabela 2). Percebe-se que o intervalo das médias entre as variáveis avaliadas nos tratamentos com e sem inoculante é maior em Dourados quando se observa as letras do teste de média utilizado. Podendo ser interpretado que o efeito da inoculação foi maior nesse local.

Tabela 2. Médias de sete variáveis avaliadas em 256 genótipos de milho, em Dourados e Caarapó, na presença (Com Ab) e ausência (Sem Ab) de inoculação de *A. brasiliense*.

Característica	Dourados		Caarapó	
	Com Ab	Sem Ab	Com Ab	Sem Ab
AP	1,88 a	1,75 b	2,07 a	2,01 ab
CE	13,78 a	13,28 ab	14,23 a	13,87 ab
DC	2,25 a	2,02 b	2,27 a	2,23 ab
IF	1,08 b	2,41 a	2,51 ab	2,76 a
MCG	272,41 a	255,72 b	285,07 a	274,23 ab
NS	3,62 a	3,06 b	4,49 a	4,38 a
PROD	2736,43 a	2296,04 b	3334,68 a	2859,44 b

AP: altura de plantas (em metros); CE: comprimento de espiga (em cm); DC: diâmetro de colmo (em cm); IF: intervalo de florescimento (em dias); MCG: massa de cem grãos (em g); NS: nota de sanidade (de 1 a 5); PROD: produtividade (em kg ha⁻¹ corrigida para 13% de umidade no grão). Letras minúsculas na mesma linha de cada ambiente indicam que genótipos não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A inoculação aumentou em média 19,2 e 16,6% a produtividade, respectivamente em Dourados e Caarapó. Os ganhos percentuais

também foram observados para a variável altura de plantas, sendo 7,4% maiores em Dourados e 3,0% em Caarapó. A massa de cem grãos teve aumento significativo em ambos ambientes, com 10,8 g a mais em Caarapó na presença da bactéria e 6,5 g em Dourados. Na presença da bactéria os genótipos reduziram o intervalo entre os florescimentos masculino e feminino nos dois ambientes, sendo o efeito maior em Dourados (36 horas) que em Caarapó (seis horas) (Tabela 2).

De maneira geral, observa-se aumento das médias das variáveis quando a bactéria foi inoculada, com exceção do intervalo entre florescimentos que diminuiu (Tabela 2). Esse efeito é interessante, pois aumento desse intervalo ocorre em situações de déficit hídrico e implica em decréscimo de produtividade devido a diminuição do número de grãos nas espigas (DE SOUZA et al., 2018).

No dia 15 de abril, a umidade relativa e acúmulo de pluviosidade estavam baixos na área experimental de Dourados (Figura 1), onde as plantas estavam com 30 DAE e 5 a 7 folhas expandidas. Esse estágio fenológico do milho é importante para a definição de componentes de produção como definição do número de fileiras (FANCELLI & DOURADO NETO, 2000; BERGAMASCHI et al., 2010). Devido a diferença de 12 dias entre a data de semeadura dos experimentos, os genótipos atingiram 30 DAE aproximadamente no dia 27 de abril em Caarapó, época em que a pluviosidade e umidade relativa estavam favoráveis para as plantas (Figura 2).

Foi observado que a inoculação em milho com espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Azospirillum* aumentam a tolerância da planta à estresse hídrico devido à um maior controle da pressão osmótica (CURÁ et al., 2017). Nesse sentido, a baixa umidade relativa atmosférica que ocorreu durante o estágio de V6 em Dourados foi considerada como fator importante para explicar o maior efeito da inoculação em Dourados.

O efeito da inoculação foi significativo para a variável altura de planta (Tabela 1). Na década de 80, acreditava-se que plantas mais altas não estariam aproveitando seus foto assimilados devidamente para o enchimento de grãos até a colheita (JOHNSON et al., 1986). Já com aumento do teto de produtividade de híbridos de milho ao passar dos anos, plantas altas passaram a ser sinônimo de maiores produtividades por apresentarem maior arquitetura para interceptação da radiação solar (FERNANDEZ et al., 2009) e capacidade de conversão da energia solar em química, utilizada na fotossíntese.

Esse aumento de altura é amplamente discutido quando se utiliza tratamentos com bactérias promotoras de crescimento exatamente pela produção de hormônios de crescimento detectada em isolados de raízes de plantas inoculadas com *A. brasiliense* (HARTMANN et al., 1983; MEDINA et al.; SOUZA et al., 2017). Nesse contexto, o aumento de altura nas plantas inoculadas foi interessante para as progênes. A produção de ácido indol acético (AIA) detectada em isolados de raízes de plantas inoculadas com *A. brasiliense* influencia no crescimento apical dos genótipos (LEITE et al., 2018), podendo explicar o aumento de altura média dos genótipos quando inoculados (Tabela 2).

O efeito significativo da inoculação observado nas variáveis AP, CE, IF, MCG, NS e PROD pode ser dado, dentre outros motivos, pela restrição de nitrogênio juntamente a moderada deficiência hídrica que ocorreu na região nos períodos de 14/abril a 15/maio (Figuras 1 e 2). É necessário aprofundar os conhecimentos acerca do efeito da inoculação da bactéria em milho com adubação nitrogenada, pois Silva et al. (2016) não observaram efeito da fixação em milho para altura de plantas e produtividade quando havia ideal disponibilidade de nitrogênio mineral.

Desta forma, é possível que a restrição de nitrogênio mineral no presente estudo colaborou para que o efeito da inoculação com *A. brasiliense* fosse significativo (GALINDO et al., 2016). A adição de amônio geralmente resulta em um declínio gradual na atividade da enzima (BROWN et al., 2016), por isso a inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio pode ter maior efeito quando se diminui a adição de amônio na semeadura.

As progênes que apresentaram maior aumento de produtividade com a inoculação não diferiram em teor de nitrogênio no grão das que diminuíram em produtividade na presença da bactéria (Tabela 3). O teor médio de nitrogênio no grão foi de 14,08 g kg⁻¹ para os mais responsivos e 13,27 g kg⁻¹ para os menos responsivos. O grão do milho não é em si um alimento proteico; o endosperma representa 83% do peso seco do grão e apresenta 83% da sua composição em amidos, não em proteína. Os maiores teores de proteína do grão estão no gérmen (PAES, 2006).

Tabela 3. Teor de nitrogênio médio avaliado em grãos de 20 genótipos que aumentaram e diminuíram produtividade com a bactéria *A. brasiliense*.

Aumentou produtividade		Diminuiu produtividade	
Genótipo	Teor de nitrogênio*	Genótipo	Teor de nitrogênio

204	14,2 A	74	10,7 A
202	14,4 A	184	12,6 A
13	15,5 A	186	12,1 A
206	16,1 A	75	12,1 A
236	16,6 A	51	12,6 A
208	15,3 A	88	11,2 A
205	13,5 A	154	11,7 A
37	14,4 A	98	14,5 A
233	11,9 A	176	13,1 A
217	17,3 A	162	12,1 A
221	16,5 A	167	13,5 A
21	17,1 A	83	12,1 A
231	13,4 A	177	12,6 A
212	13,5 A	96	13,5 A
223	12,3 A	86	12,1 A
230	14,4 A	60	11,7 A
243	16,1 A	168	13,1 A
215	14,3 A	92	13,1 A
224	16,3 A	171	12,6 A
229	15,2 A	52	12,1 A

* : teor expresso em g kg⁻¹ de matéria seca. Médias seguidas de letras iguais na coluna não apresentam diferenças significativas para o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De maneira generalizada, a inoculação de milho com bactérias da espécie *Azospirillum brasiliense* é uma tecnologia que pode aumentar a produção da cultura e diminuir os custos de produção. Para tanto, é necessário que o genótipo de milho responda positivamente à presença da bactéria e que a dose da adubação nitrogenada seja bem manejada. Uma vez que a inoculação diminui a necessidade de adubação química (HRIDYA et al., 2012; SHAKERI et al., 2015; ABBASDOKHT et al., 2016), a tecnologia milho-*Azospirillum* pode ser uma alternativa que contribui para o desenvolvimento uma agricultura mais sustentável.

4. CONCLUSÕES

A resposta do milho ao uso de *Azospirillum brasiliense* é dependente do genótipo e do ambiente e que se inocula. Os genótipos podem aumentar, diminuir ou manter a produtividade quando inoculados em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio. A opção de inocular o milho com *Azospirillum* deve ser considerada quando o genótipo apresenta eficiente associação com a mesma.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABBASDOKHT, H.; CHAICHI, M. R.; ASADI, S.; NAZARI, M.; NORAN, M. M.; KHADEMI, H. R. Effects of types of nitrogenous fertilizer (biological, chemical, integrative) and cropping mixes on some forage-medicine characteristics in additive intercropping of sorghum (*Sorghum bicolor* [L.] Moench) with fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 62, n.12, p. 1741-1752, 2016.
- ABERA, W.; HUSSEIN, S.; DERERA, J.; WORKU, M.; LAING, M. Heterosis and combining ability of elite maize inbred lines under northern corn leaf blight disease prone environments of the mid-altitude tropics. **Euphytica**, v.208, n.2, p.391-400, 2016.
- BAR T, OKON Y. Tryptophan conversion to indole-3-acetic acid via indole-3-acetamide in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Canadian Journal of Microbiology**, v.39, p.81-86, 1993.
- BASHAN, Y. Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review. **Biology and Fertility of Soils**, v.29, n.3, p.246-256, 1999.
- BERGAMASCHI, H.; DALMAGO, G. A.; BERGONCI, J. I.; KRÜGER, C. A. M. B.; HECKLER, B. M. M.; COMIRAN, F. Intercepted solar radiation by maize crops subjected to different tillage systems and water availability levels. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.12, p.1331-1341, 2010.
- BROWN, K. A.; HARRIS, D. F.; WILKER, M. B.; RASMUSSEN, A.; KHADKA, N.; HAMBY, H.; KING, P. W. Light-driven dinitrogen reduction catalyzed by a CdS: nitrogenase MoFe protein biohybrid. **Science**, v.352, n.6284, p.448-450, 2016.
- CASSÁN, F.; DÍAZ-ZORITA, M. The Contribution of the Use of *Azospirillum* sp. in Sustainable Agriculture: Learnings from the Laboratory to the Field. In **Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability** p.293-321, Springer, Singapore, 2016.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Indicadores da Agropecuária**. n.4, 2017.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Primeiro levantamento. v. 6 - safra 2018/19. ISSN: 2318-6852. Outubro de 2018. Brasília. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em: 1 nov. 2018.

COSTA-PEREIRA, R.; RUDOLF, V. H.; SOUZA, F. L.; ARAÚJO, M. S. Drivers of individual niche variation in coexisting species. **Journal of Animal Ecology**, v.87, n.5, p.1452-1464, 2018.

CRITTENDEN, S. J.; POOT, N.; HEINEN, M. D. J. M.; VAN BALEN, D. J. M.; PULLEMAN, M. M. Soil physical quality in contrasting tillage systems in organic and conventional farming. *Soil and Tillage Research*. v.154, p.136-144, 2015.

CURÁ, J. A.; FRANZ, D. R.; FILOSOFÍA, J. E.; BALESTRASSE, K. B.; BURGUEÑO, L. E. Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. Bacteria Increases the Tolerance of Maize to Drought Stress. **Microorganisms**. v.5, n.3, p.41-56, 2017.

DÖBEREINER, J.; DE SALAMONE, I. G.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the 15 N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v.23, n.3, p.249-256, 1996.

DE CARVALHO, H. W. L.; LEAL, M. D. L. D. S.; CARDOSO, M. J.; DOS SANTOS, M. X.; TABOSA, J. N.; DOS SANTOS, D. M.; LIRA, M. A. Adaptabilidade e estabilidade de híbridos de milho em diferentes condições ambientais do Nordeste Brasileiro. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**. v.1, n.2, p.75-82, 2010.

DE RESENDE, M. D. V.; DUARTE, J. B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.37, p.182-194, 2007.

DE SOUSA, R. S.; BASTOS, E. A.; CARDOSO, M. J.; PEREIRA, D. R. Identificação de genótipos de milho para tolerância à seca por análise multivariada. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.16, p.204-211, 2018.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Ecofisiologia e fenologia. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000. p. 21-54.

FERNANDEZ, M. G. S.; BECRAFT, P. W.; YIN, Y.; LÜBBERSTEDT, T. From dwarves to giants? Plant height manipulation for biomass

yield. **Trends in plant science**, v.14, n.8, p.454-461, 2009.

FORTE, I. H. & GARCÍA, M. C. N. Effect of different carbon sources on the growth of a rhizobia strain. **Cultivos Tropicales**, v.39, n.3, 87-91, 2018.

FREY, S. D.; ELLIOTT, E. T.; PAUSTIAN, K. Bacterial and fungal abundance and biomass in conventional and no-tillage agroecosystems along two climatic gradients. **Soil Biology and Biochemistry**, v.31, n.4, p.573-585, 1999.

FURLANI, Â. M. C.; FURLANI, P. R.; TANAKA, R. T.; MASCARENHAS, H. A. A.; DELGADO, M. D. D. P. Variability of soybean germplasm in relation to phosphorus uptake and use efficiency. **Scientia Agricola**, v.59, n.3, p.529-536, 2002.

GALINDO, F. S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; BUZETTI, S.; SANTINI, J. M. K.; ALVES, C. J.; NOGUEIRA, L. M.; BELLOTTE, J. L. M. Corn yield and foliar diagnosis affected by nitrogen fertilization and inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.40, 2016.

GUARESCHI, R. F. G.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; SARKIS, L. F.; MARTINS, M. R.; JANTALIA, C. P.; URQUIAGA, S. Nitrogen, phosphorus and potassium balance in agriculture of Latin America and the Caribbean. **Journal Terra Latinoamericana**, v.37, n.2, p.105-119, 2019.

HARTMANN, A.; SINGH, M.; & KLINGMÜLLER, W. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, n.8, p.916-923, 1983.

HRIDYA, A.C.; BYJU, G.; MISRA, R. S. Effect of biocontrol agents and biofertilizers on root rot, yield, harvest index and nutrient uptake of cassava (*Manihot esculanta Crantz*). **Archives of Agronomy and Soil Science**. v. 59, n.9, p.1215-1227, 2012.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**. v.331, n.1-2, p.413-425, 2010.

HUTCHINSON, G.E. Concluding remarks. **Cold Spring Harbour Symposium on Quantitative Biology** v.22, p.415-427, 1957.

JANUŠAUSKAITE, D.; KADŽIENĖ, G.; AUŠKALNIENĖ, O. The Effect of Tillage System on Soil Microbiota in Relation to Soil Structure. **Polish Journal of Environmental Studies**, v.22, n.5, p.1387-1391, 2013.

- JOHNSON, E. C.; FISCHER, K. S.; EDMEADES, G. O.; PALMER, A. F. E. Recurrent Selection for Reduced Plant Height in Lowland Tropical Maize. **Crop Science**, v.26, n.2, p.253-260, 1986.
- KERBAUY, Gilberto Barbante. **Fisiologia Vegetal**. 1 ed. Guanabara: Koogan, p.472, 2004.
- LAUDICINA, V. A.; NOVARA, A.; BARBERA, V.; EGLI, M.; BADALUCCO, L. Long-term tillage and cropping system effects on chemical and biochemical characteristics of soil organic matter in a Mediterranean semiarid environment. **Land Degradation & Development**, v.26, n.1, p.45-53, 2015.
- LEITE, M. C. D. B. S.; DE ARAUJO PEREIRA, A. P.; DE SOUZA, A. J.; ANDREOTE, F. D.; FREIRE, F. J.; SOBRAL, J. K. Bioprospecção e diversidade genética de bactérias endofíticas associadas a plantas de mandioca. **Revista Caatinga**, v.31, n.2, p.315-325, 2018.
- LONGHINI, V. Z.; DE SOUZA, W. C. R.; ANDREOTTI, M.; DE ÁVILA SOARES, N.; COSTA, N. R. Inoculação de bactéria diazotrófica e adubação nitrogenada de cobertura em milho irrigado. **Revista Caatinga**, v.29, n.2, p.338-347, 2016.
- MEDINA, E. F.; SILVA, B. E. C.; OBOLARI, A. M. M.; CARDOSO, F. B.; RIBEIRO, D. M. Síntese de etileno e respostas fotossintéticas em plantas de feijão e milho expostos a auxinas. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.16, n.2, p.130-141, 2017.
- MENDES, I. C.; HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Soybean response to starter nitrogen and *Bradyrhizobium* inoculation on a Cerrado Oxisol under no-tillage and conventional tillage systems. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, n.1, p.81-87, 2003.
- MENDES, L. W.; KURAMAE, E. E.; NAVARRETE, A. A.; VAN VEEN, J. A.; TSAI, S. M. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. **The ISME journal**, v.8, n.8, p.1577-1583, 2014.
- MOMMER, L.; HINSINGER, P.; PRIGENT-COMBARET, C.; VISSER, E. J. Advances in the rhizosphere: stretching the interface of life. **Plant and soil**, v.407, n.1, p.1-8, 2016.
- CERRÓN, M. R.; YUPANQUI, F. R. Dinámica poblacional de *Azotobacter* spp., en relación al contenido de materia orgánica en una plantación de *E. grandis* Hill-Purumayo, Oxapampa–Pasco. **Ambiente**, v.1, p.1-2, 2017.
- NEUMANN, M.; HORTS, E. H.; FIGUEIRA, D. N.; LEÃO, G. F. M.; CECCHIN, D. Potential of corn silage production in different sowing

times in the Paraná Midwest region. **Applied Research & Agrotechnology**, v.9, n.1, p.37-44, 2016.

NGUYEN, M. L.; SPAEPEN, S.; DU JARDIN, P.; DELAPLACE, P. Biostimulant effects of rhizobacteria on wheat growth and nutrient uptake depend on nitrogen application and plant development, **Archives of Agronomy and Soil Science**, v.65 p.58-73, 2018.

PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2006.

PEDROZO, A.; DE OLIVEIRA, G.; JOÃO, N.; ALBERTON, O. Biological nitrogen fixation and agronomic features of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) crop under different doses of inoculant. **Acta Agronomica**, v.67, n.2, p.297-302, 2018.

QUADROS, P. D.; ROESCH, L. F. W.; SILVA, P. R. F.; VIEIRA, V. M.; ROEHRS, D. D.; CAMARGO, F. A. O. Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v.61, n.2, p.209-218, 2014.

RAIJ, Bernardo Van. Nitrogênio. In: RAIJ, Bernardo Van. **Fertilidade do solo e adubação**. São Paulo; Piracicaba: Editora Agronômica Ceres, p.343, 1991.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2018.

SHAKERI, E.; SEYED, A. M. M. S.; DEHAGHI, M. A.; TABATABAEI, S.A.; MEHRDAD MORADI-GHAHDERIJANI. Improvement of yield, yield components and oil quality in sesame (*Sesamum indicum* L.) by N-fixing bacteria fertilizers and urea. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v.62, n.4, p.547-560, 2015.

SILVA, A. G.; DUARTE, A. P.; PIEDADE, R. D. C.; COSTA, H. P.; MEIRELES, K. G. C.; BORGES, L. P. Inoculação de sementes de milho safrinha com *Azospirillum* e aplicação de nitrogênio em cobertura. **Revista Brasileira Milho e Sorgo**. v.14, p.358-370. 2016.

SILVA, T. E. D.; DETMANN, E.; FRANCO, M. D. O.; PALMA, M. N. N.; ROCHA, G. C. Evaluation of digestion procedures in Kjeldahl method to quantify total nitrogen in analyses applied to animal nutrition. **Acta Scientiarum**, v.38, n.1, p.45-51, 2016.

SOUZA, A. J. D.; MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F. D. A. A. Gene silencing: concepts, applications, and perspectives in woody plants. **Scientia Agricola**, v.64, n.6, 645-656, 2007.

SOUSA, D.M.G. de; LOBATO, E. Calagem e adubação para culturas anuais e semiperenes. In: SOUSA, D.M.G. de; LOBATO, E. (Ed.). **Cerrado: correção do solo e adubação**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p.283-315, 2004

SOUZA, M. S.; DE BAURA, V. A.; SANTOS, S. A.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I.; JUNIOR, F. B. R.; MARQUES, M. R.; DA SILVA BRASIL, M. *Azospirillum spp.* from native forage grasses in Brazilian Pantanal floodplain: biodiversity and plant growth promotion potential. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.33, n.4, p.81-88, 2017.

SUN, J.; VAN DOMMELEN, A.; VAN IMPE, J.; VANDERLEYDEN, J. Involvement of *glnB*, *glnZ*, and *glnD* genes in the regulation of poly-3-hydroxybutyrate biosynthesis by ammonia in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 985-988, 2002.

TOLLENAAR, M.; LEE, E. A. Yield potential, yield stability and stress tolerance in maize. **Field Crops Research**, v.75, n.2-3, p.161-169, 2002.

USDA. United States Department of Agriculture. World Agricultural Production. Circular series. 2018. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>. Acesso em: 01 dez. 2018.

VINHAL-FREITAS, I. C.; RODRIGUES, M. B. Fixação biológica do nitrogênio na cultura do milho. **Agropecuária Técnica**. v.31, n.2, p.143-154, 2010.

ZHAO, S.; LI, K.; ZHOU, W.; QIU, S.; HUANG, S.; HE, P. Changes in soil microbial community, enzyme activities and organic matter fractions under long-term straw return in north-central China. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.216, p.82-88, 2016.

CAPÍTULO 2

GGE-*Biplot* DE UM ÍNDICE MULTIVARIADO NA SELEÇÃO DE PROGÊNIES DE MILHO DE EFICIENTE ASSOCIAÇÃO COM *Azospirillum brasiliense*

RESUMO

CECCON, Felipe. **GGE-*Biplot* de um índice multivariado na seleção de progênies de milho de eficiente associação com *Azospirillum brasiliense***. 2019. 24 f. Orientador: Dr. Manoel Carlos Gonçalves.

O milho é bastante cultivado no Brasil, e o nitrogênio é um grande limitante para sua produtividade. Bactérias fixadoras de nitrogênio auxiliam no aporte do nutriente à planta, entretanto a simbiose milho-*Azospirillum* não é tão eficiente e requer seleção de genótipos de associação mais eficiente. A necessidade de seleção por meio de muitas variáveis levou ao desenvolvimento de índices de seleção, permitindo que a seleção fosse realizada usando um único valor. A análise GGE-*Biplot* permite a visualização dos efeitos de genótipo e sua interação com o ambiente avaliados em uma variável. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo selecionar progênies de eficiente interação com bactérias do gênero *Azospirillum brasiliense* bem como estudar a eficiência da seleção de progênies por meio de um índice multivariado observado no método GGE-*Biplot*. Os experimentos foram realizados em dois municípios do estado do Mato Grosso do Sul. Foram avaliados 256 genótipos, em látice simples 16 x 16, na presença e ausência da bactéria diazotrófica. Para a construção do índice de seleção, foram medidas as características altura

de planta, comprimento de espiga, diâmetro de colmo, intervalo de florescimento masculino e feminino, massa de cem grãos, nota de sanidade e produtividade. Os genótipos apresentaram efeito significativo da interação genótipo-ambiente para todas as características avaliadas, permitindo o uso de todas para o cálculo do índice. O índice de seleção subestimou a produtividade de alguns genótipos, tornando importante o uso das médias dessa variável como parâmetro para a seleção. 37 progênies tiveram aporte de produtividade quando inoculadas nos dois locais de avaliação. Entretanto, utilizando o índice de seleção por meio do gráfico GGE *biplot*, apenas 29 delas continuam selecionadas como de eficiente associação com a bactéria. A seleção por meio das médias de produtividade com a visualização do gráfico GGE-*Biplot* permitiu seleção de genótipos produtivos, estáveis e de eficiente associação com a bactéria.

Palavras-chave: *Zea mays* L., Bactérias fixadoras de nitrogênio, melhoramento de milho.

CHAPTER II

GGE-*Biplot* OF A MULTIVARIATED INDEX FOR SELECTING MAIZE PROGENIES OF EFFICIENT ASSOCIATION WITH *Azospirillum Brasiliense*

ABSTRACT

CECCON, Felipe. **GGE-*Biplot* of a multivariated index for selecting maize progenies of efficient association with *Azospirillum Brasiliense***. 2019. 24 p. Advisor: Dr. Manoel Carlos Gonçalves.

Maize is widely cultivated in Brazil, and nitrogen is a major nutrient on its yield. Nitrogen-fixing bacteria help in the nutrient supply to the plant, however the maize-*Azospirillum* symbiosis is not as efficient and requires selection of genotypes with more efficient association. The need for selection through many variables led to the development of selection indexes, allowing the selection to be performed using a single value. The GGE-*Biplot* analysis allows the visualization of the effects of genotype and its interaction with the environment evaluated in one variable. In this context, the present study aimed to select progenies of efficient interaction with *Azospirillum brasiliense* bacteria as well as to study the efficiency of progeny selection using a multivariate index observed in the GGE-*Biplot* method. The experiments were carried out in two sites in the state of Mato Grosso do Sul. 256 genotypes were evaluated, in a simple 16x16 lattice, in the presence and absence of the diazotrophic bacteria. For the construction of the selection index, the characteristics of plant height, spike length, stem diameter, male and female flowering interval, one hundred grain mass, sanity grade and yield were measured. The genotypes showed a significant effect of the genotype-environment interaction for all evaluated characteristics, allowing the use of all for them on the selection index. This parameter underestimated some high-yielding genotypes, making it important to use this trait means as a selection parameter. 37 progenies had increased their yield when inoculated at the two evaluation sites. However, using the selection index with the GGE biplot graph, only 29 of them are still selected as of efficient association with the bacteria. The selection through yield means combined with the selection index visualized on the GGE-*Biplot* graph allowed the selection of genotypes with high and stable yielding and with efficient association to the bacteria.

Keywords: *Zea mays* L, Nitrogen fixing bacteria, maize breeding.

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um cereal cultivado em grande parte do mundo e que tem um alto potencial produtivo. A produção mundial nas

safras 2017/2018 foi de 1,04 bilhões de toneladas (CONAB, 2018), e concentrou-se basicamente em três grandes produtores: Estados Unidos, China e Brasil. Esses países representam 65,62% da produção mundial de milho, sendo a produtividade altamente dependente da nutrição da planta durante o cultivo, principalmente do nitrogênio (LONGHINI et al, 2017).

Na atmosfera terrestre, 79% da fração gasosa é composta pelo nitrogênio, entretanto o elemento está em sua forma elementar (N_2); não assimilável pela planta. A forma mais utilizada para tornar o nitrogênio assimilável pelas raízes das plantas é a adição de fertilizantes industriais, porém é um processo oneroso que consome combustível fóssil não renovável. Uma forma alternativa para disponibilizar nitrogênio às plantas é por meio mineralização da matéria orgânica, cujo aporte é notado em sistemas que incluem a rotação de cultura (BERGAMASCHI et al., 2006).

Na soja, principal cultura agrícola cultivada no país, o fornecimento do nitrogênio é feito por bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, as quais realizam simbiose com a planta e disponibilizam o nutriente no interior das células das raízes. No milho, essa simbiose ocorre com bactérias do gênero *Azospirillum*, entretanto não causam infecção ou fixam o nitrogênio às células, tornando o uso de organismos diazotróficos em milho não tão eficiente como na soja (HUNGRIA, 2010).

O gênero *Azospirillum* é caracterizado por bactérias de vida livre que habitam tanto a rizosfera quanto o interior da raiz do milho. Esse mecanismo de associação sem nodulação torna a associação pouco eficiente pelo fato de a planta precisar absorver o nutriente que foi fixado na solução do solo. Entretanto, existe desempenho divergente entre híbridos inoculados com *Azospirillum*, de forma que alguns genótipos podem ser mais produtivos em função da inoculação, enquanto outros, podem vegetar por mais tempo resultando em menor produtividade (DE QUADROS et al., 2014).

A importância de selecionar genótipos de eficiente associação com bactérias fixadoras de nitrogênio pode contribuir para a diminuição da dependência de fertilizantes minerais. O nitrogênio adicionado por meio da ureia, por exemplo, está sujeito a redução a amônia e consequente perda por volatilização. A inoculação com bactérias do gênero *Azospirillum*, além de auxiliar no aporte de nitrogênio orgânico, altera a composição da microbiota da rizosfera afetando também aspectos como a resistência de plantas à patogênese (MENDES et al., 2014). Nesse contexto, a seleção de genótipos de eficiente interação com *Azospirillum* é decisiva para obtenção de lucro com a inoculação e desempenha

importante avanço rumo a sustentabilidade.

A seleção por meio de x variáveis observadas em i indivíduos testados em k locais pode ser complexa devido ao grande número de informações obtidas experimentalmente (ARAUJO & VIVAS, 2018). A estatística multivariada é uma ferramenta sugerida no melhoramento para transformar as variáveis originais em uma nova variável resposta, formando um índice de seleção de genótipos (CROSSA, 1990; FERREIRA, 1996).

A análise *GGE-Biplot* é outra ferramenta utilizada no melhoramento para a avaliação de genótipos em diversos ambientes. Essa análise possibilita o desdobramento dos efeitos de genótipo (G), ambiente (E) e interação genótipo-ambiente (GE) observados em uma variável e constrói gráficos que permitem a visualização da adaptabilidade e estabilidade dos genótipos. A ferramenta utiliza apenas os efeitos que envolvem o desempenho dos genótipos, ou seja, G + GE, sendo então denominada *GGE-Biplot* (YAN et al., 2000).

Nesse contexto, o trabalho foi realizado com o objetivo de selecionar progênies de eficiente interação com bactérias do gênero *Azospirillum brasiliense* bem como estudar a eficiência da seleção de progênies por meio de um índice multivariado observado no método *GGE-Biplot*.

2. MATERIAL E METODOS

2.1 Condições experimentais e caracterização dos genótipos

Os experimentos foram implantados em dois locais: na Fazenda Experimental de Ciências Agrárias (FAECA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), em Dourados, Mato Grosso do Sul (MS), com localização de 22° 11' 55" S, 54° 56' 07" O, altitude de 452 m e no sitio São José, em Caarapó, MS, de coordenadas 22°33'07,3"S, 54°50'01,3" O, altitude de 411m. O clima dos municípios citados, segundo a classificação de Köppen é do tipo Cwa, com verões quentes e invernos secos, temperaturas máximas durante os meses de dezembro e janeiro e as temperaturas mínimas entre maio e agosto.

As sementeiras foram realizadas no dia 9 de março em Dourados e 21 de março em Caarapó. No dia anterior à sementeira de Dourados, o solo foi preparado com subsolador com haste de 30 cm e uma grade aradora. A adubação foi realizada no sulco de sementeira com sementeira, regulada para distribuir 200 kg ha⁻¹ do adubo 8-20-18 (25 kg de N), segundo análise de solo e exigências da cultura (SOUZA & LOBATO, 2004).

Em Caarapó, o milho foi cultivado em sementeira direta após cultivo de soja e a propriedade estava no quinto ano sem revolvimento do solo. A adubação foi feita na linha de sementeira, com 150 kg ha⁻¹ da fórmula 11-31-17 + 90 kg ha⁻¹ de KCl distribuídos à lanço (22 Kg de N). Em Dourados o solo foi mantido em pousio antes da implantação dos experimentos. Nos dois locais, a adubação de cobertura foi realizada 30 dias após a emergência (DAE) adicionando 15 kg ha⁻¹ de Ureia (45% N) ao lado da linha de sementeira (7 Kg de N).

Em soma, foram disponibilizados 32 e 29 kg de N respectivamente nos experimentos em Dourados e Caarapó, o que segundo uma média de 25 ensaios apresentada por Raij (1991) permite atingir produtividades de até 4.500 kg ha⁻¹. Essa sub dose do nutriente foi imposta pelo fato de que a enzima nitrogenase diminui sua atividade metabólica na presença de amônio, fazendo com que as bactérias acumulem compostos energéticos em detrimento de quebrar moléculas de N₂ ocasionando na fixação nitrogênio (SUN et al., 2002).

Em Dourados, com 30 DAE, foram realizadas pulverizações de 28 g ha⁻¹ de Tiametoxan + 21 g ha⁻¹ de Lambda-cialotrina. Com 50 DAE foram aplicados 100 g ha⁻¹ de imidacloprido, com 15 g ha⁻¹ de Teflubenzurom e 1 kg ha⁻¹ de atrazina. Em Caarapó, aos 30 DAE foram aplicados 86 g ha⁻¹ de metomil, aos 45 foram 40 g ha⁻¹ de bifentrina com 62 g ha⁻¹ de azoxistrobina com 62 g ha⁻¹ de flutriafol e aos 57 DAE foram aplicados 20 g ha⁻¹ de clorantraniliprole com 2 kg ha⁻¹ de atrazina. Aos 40 e aos 60 DAE foi aplicado 1 L ha⁻¹ de um fertilizate líquido (12g de Carbono Orgânico, 50g de N, 12g de P₂O₅, 12g de Ca, 12g de Mg, 23g de S, 4g de Bo, 37g de Mn, 1g de Mo, 12g de Zinco e 1g de Ni).

As condições climatológicas durante o período de condução dos experimentos foram mensuradas pelas estações meteorológicas automáticas da EMBRAPA (Figuras 5 e 6)

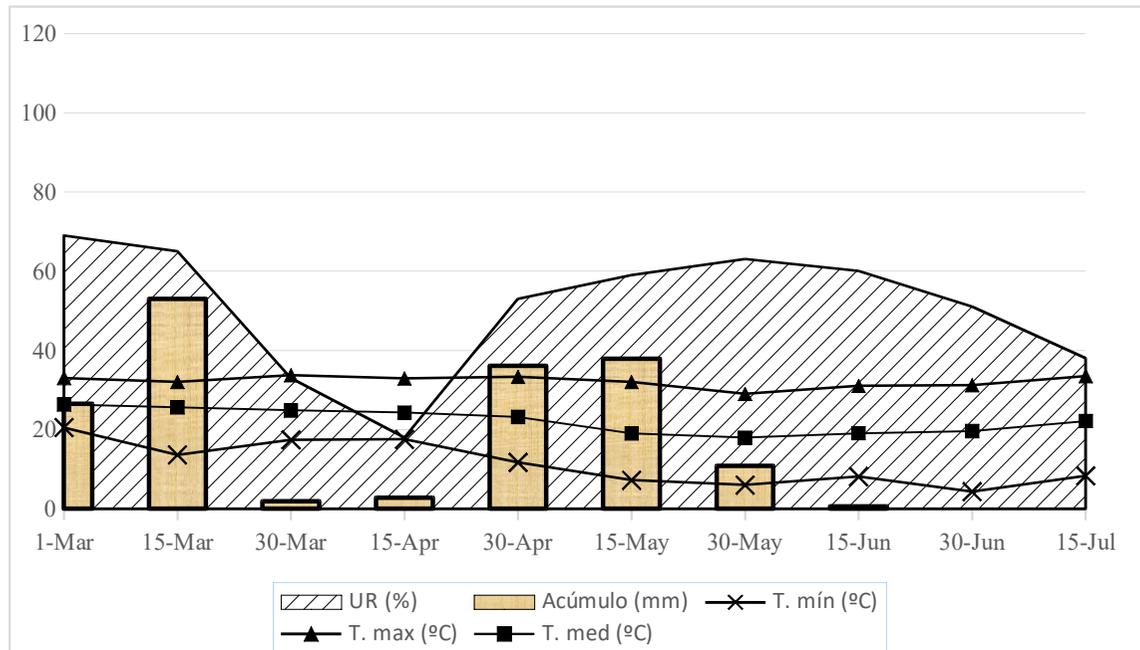


Figura 5. Dados quinzenais de umidade relativa (UR), pluviosidade (acúmulo em mm), temperatura mínima, temperatura máxima e temperatura média (em °C) da região de Dourados nos meses de março a julho de 2018 (INMET, 2018).

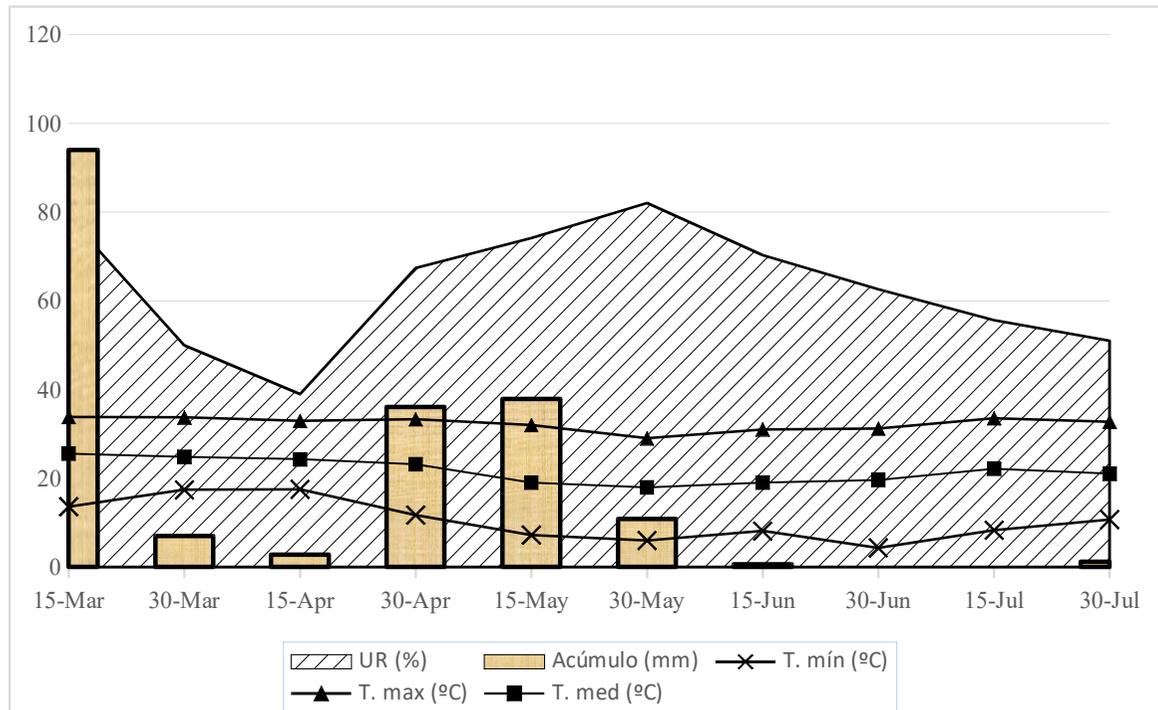


Figura 6. Dados quinzenais de umidade relativa (UR), pluviosidade (acúmulo em mm), temperatura mínima, temperatura máxima e temperatura média (em °C) da região de Caarapó nos meses de março a julho de 2018 (EMBRAPA, 2018).

Foram avaliados 256 genótipos, sendo 250 progênies de meio irmão (PMI), cinco cultivares progenitores dessas 250 PMI e uma cultivar adaptada a região adicionada ao delineamento como um genótipo testador. Para a obtenção das progênies, essas cinco cultivares (três variedades de polinização aberta e dois híbridos simples) foram semeadas na safra 2017/2018 em campo isolado para evitar contaminação por pólen exógeno. Foram selecionadas 50 espigas de cada cultivar, as quais foram debulhadas e passadas por tratamento de semente para serem avaliadas.

O delineamento experimental utilizado nessa avaliação foi o látice simples 16x16 devido ao elevado número de genótipos. Cada unidade experimental consistiu de uma linha de 3,30 m, espaçada em 0,33 m entre plantas e 0,45 m entre linhas. Foram semeadas duas sementes por cova e, aos 21 dias após emergência (DAE), foi realizado o desbaste das covas em que as duas sementes germinaram, deixando uma planta por cova,

resultando em estande de 10 plantas por parcela representando população de aproximadamente 74 mil plantas ha⁻¹.

2.2 Tratamentos e variáveis avaliadas

Os genótipos foram submetidos a presença e ausência da inoculação com bactérias da espécie *Azospirillum brasiliense*. A inoculação foi feita quatro horas antes da semeadura utilizando a dose de 150 mL ha⁻¹ recomendada pelo fabricante do produto (garantia de concentração mínima: 2,0 x 10⁸ células viáveis mL⁻¹).

Para verificação do desempenho dos genótipos foram avaliadas as seguintes variáveis quantitativas: i) altura de planta (AP): média de cinco plantas centrais na parcela mensurada, em metros, do colo da planta até a inserção do pendão; ii) comprimento de espiga (CE): média de cinco espigas aleatórias mensurada, em cm, da base à ponta das espigas; iii) diâmetro de colmo (DC): média de cinco plantas do centro da parcela avaliada, em cm e com um paquímetro, a um metro de altura do solo no meio do entrenó; iv) intervalo de florescimento (IF): diferença de dias entre o florescimento masculino e florescimento feminino de todas as plantas na parcela; v) nota de sanidade (NS): valor atribuído visualmente durante o florescimento variando de 1 a 5, onde 1 é uma parcela com 80 a 100% das folhas com sintomas de ataque por pragas ou doenças, 2 é uma parcela com 60 a 80% das folhas com sintomas de ataque, 3 é uma parcela com 40 a 60% das folhas com sintomas de ataque, 4 é uma parcela com 20 a 40% das folhas com sintomas de ataque e 5 é uma parcela com 0 a 20% das folhas danificadas; vi) massa de mil grãos (MCG): massa de cem grãos de cada parcela, em gramas, e corrigida para 13% de umidade no grão; e vii) produtividade de grãos (PROD): obtida por meio do peso de grãos de todas as plantas da parcela, para 13% de umidade e extrapolado por regra de três para kg ha⁻¹.

2.3 Análises estatísticas

Antes da análise de variância (Anova), foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar a homogeneidade da variância residual. Posteriormente, a Anova foi realizada considerando os efeitos de genótipos, locais e inoculação, com o objetivo de determinar possível

significância na interação de genótipos de milho com a bactéria *Azospirillum brasiliense* e os locais de avaliação.

A análise da variância foi realizada de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + (b/r \text{ Ab} || L)_{ijklm} + \epsilon_{ijklm}$$

Nesse modelo, Y_{ijklm} é a observação do i -ésimo genótipo ($i = 1, 2, \dots, 256$), no j -ésimo bloco ($j = 1, 2, \dots, 16$), na k -ésima repetição ($k = 1, 2$), com o m -ésimo tratamento de inoculação ($m = 1, 2$) e no l -ésimo local ($l = 1, 2$);

μ é a constante geral;

$(b/r \text{ Ab} || L)_{ijklm}$ é o efeito fixo do j -ésimo bloco, dentro da k -ésima repetição, com o m -ésimo tratamento de inoculação no l -ésimo local;

$(b/r \text{ Ab} || L)_{ijklm}$ é o efeito fixo da k -ésima repetição com o m -ésimo tratamento no l -ésimo local;

G_i é o efeito fixo do i -ésimo genótipo;

Ab_m é o efeito fixo do m -ésimo tratamento de *Azospirillum brasiliense*;

$G * Ab_{ij}$ é o efeito fixo da interação entre o i -ésimo genótipo com o m -ésimo tratamento de *Azospirillum brasiliense*;

L_l é o efeito fixo do l -ésimo local;

$G * L_{il}$ é o efeito fixo da interação do i -ésimo genótipo com o l -ésimo local l ;

$Ab * L_{ml}$ é o efeito fixo da interação do m -ésimo tratamento de *Azospirillum brasiliense* com o l -ésimo local;

$G * Ab * L_{ilm}$ é o efeito fixo da interação do i -ésimo genótipo, com o m -ésimo tratamento de *Azospirillum brasiliense* e o l -ésimo local;

ϵ_{ijklm} é o erro aleatório experimental médio associado à observação Y_{ijklm} com NID ($0, \sigma^2$).

Após verificação das variáveis que apresentaram interação $G*Ab*L$ significativa, as mesmas foram padronizadas dividindo os valores pelo desvio padrão de cara variável. Foi realizada a análise multivariada, para a obtenção da matriz de variâncias e covariâncias das variáveis, utilizando o modelo $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_{ij} + \epsilon_{ij}$, conforme Ferreira (1996). No modelo, Y_{ij} é referente às observações do i -ésimo genótipo, no j -ésimo ambiente, μ é o vetor das médias das características avaliadas, α_i é o vetor de efeitos dos genótipos, β_j é o vetor de efeitos dos ambientes, δ_{ij} é o vetor de efeitos da interação dos genótipos e ambientes e ϵ_{ijk} é o vetor de efeitos residuais correspondentes. Observa-se também que esse

modelo se difere do utilizado na análise univariada para salientar que cada um dos quatro experimentos representam agora um local de avaliação.

Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para os efeitos residuais com o intuito de checar a distribuição normal multivariada das sete variáveis. Após a verificação de tal pressuposição, a matriz $_{7 \times 7}$ de soma de quadrados e produtos residuais teve cada elemento dividido pelo grau de liberdade do resíduo, gerando a matriz S (de variâncias e covariâncias residuais).

A seleção dos genótipos foi feita por meio de dois parâmetros: das médias fenotípicas de produtividade e do desempenho dos mesmos no índice de seleção multivariado, utilizando o método *GGE-Biplot*. Para ponderar as variáveis utilizadas na construção do índice multivariado, a análise *Genotype by Trait Biplot* (*GT-Biplot*) foi realizada conforme proposto por Wickham (2009) e utilizada por Araujo & Viva (2018); Oliveira et al. (2018).

O índice é composto pela distância generalizada de Mahalanobis dos genótipos avaliados em relação a um ideótipo teórico. Esse ideótipo se trata de um valor atribuído à variável qual foram valores ideais às variáveis avaliadas no experimento, se transformando em uma variável resposta não observável que foi calculada em cada parcela por meio da diferença entre as sete características mensuradas e o valor ideal atribuído para cada uma delas.

Os valores de ideótipo atribuído para cada variável foram valores acima do maior valor observado em qualquer parcela. Para a variável AP, o maior valor observado foi de 2,17 cm, logo o valor ideal atribuído foi de 2,4 cm. O CE teve como ideótipo de 18 cm, para DC o valor foi de 3,6 cm, 0 dias para IF, 370 g para MCG e 7.000 kg ha⁻¹ para PROD.

O cálculo do índice foi feito por meio de álgebra de matrizes conforme a expressão $D^2 = \text{diag}(I S^{-1} I')$. Nessa expressão, D^2 é o vetor_{2048x1} de distâncias das parcelas ao ideótipo, I é a matriz_{2048x7} das diferenças entre cada uma das características avaliadas nas parcelas e o valor ideal para a característica, S^{-1} é a transposta da matriz_{7x7} de variâncias e covariâncias obtida por meio da análise multivariada das seis características e I' é a inversa_{7x2048} da matriz de diferenças entre características e valores ideais.

Observa-se que resolvendo o termo $I S^{-1} I'$, obtém-se uma matriz de ordem 2048x2048, entretanto o termo *diag* faz com que o resultado da expressão completa seja apenas os elementos da diagonal principal da matriz, que corresponde às distâncias de cada parcela ao ideótipo.

Como a interpretação da distância é o contrário da produtividade, isto é, quanto menor a distância maior o desempenho do genótipo, os valores em cada parcela foram diminuídos de 2000, que é o valor do milhar acima da parcela mais distante, caracterizando a variável índice de seleção de distância do ideótipo (ISDI).

Após a obtenção do ISDI, foram realizados os testes de Shapiro-Wilk, para testar a normalidade dos resíduos e a análise de variância dessa variável, para avaliar a interação GxA e utilizar as médias para avaliar a adaptabilidade e estabilidade dos genótipos. O gráfico GGE *Biplot* foi construído com base nos valores de ISDI atribuídos a cada genótipo em cada ambiente. O modelo $\bar{Y}_{ij} - \mu_j - \beta_j = \lambda_1 \xi_{i1} \eta_{1j} + \lambda_2 \xi_{i2} \eta_{2j} + \varepsilon_{ij}$ foi o utilizado para construção dos pontos e vetores no gráfico. Nesse modelo, \bar{Y}_{ij} é o valor médio do ISDI do genótipo i no ambiente j , μ_j é a média do índice no ambiente j , β_j é o efeito principal do ambiente j , λ_1 e λ_2 são os maiores autovalores dos componentes principais (CP) 1 e 2 da ACP, que multiplicam ξ e η ; autovetores de cada componente referentes ao genótipo e ao ambiente respectivamente.

A análise de variância, os cálculos de matrizes e a construção dos gráficos GGE *Biplot* e GT *Biplot* foram realizadas utilizando o aplicativo computacional R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2018).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foi observado na análise univariada que as sete variáveis observadas apresentaram interação significativa a 1% de probabilidade entre os efeitos de Local, Genótipo e *Azospirillum brasiliense*, o que dificulta a interpretação de qual dessas fontes de variação contribuiu mais para o efeito ser significativo. Por outro lado, esse resultado torna interessante a inclusão de todas as variáveis na análise multivariada (Manova).

Para solucionar o problema da interação tripla, Araújo et al. (2010) avaliaram uma interação entre genótipos, ambientes e anos por meio da análise *Biplot*, a qual permitiu o estudo de qual fonte de variação contribuiu mais pra interação significativa. Assim, a interação tripla do presente estudo foi interpretada pela análise GGE-*Biplot* por serem utilizados apenas os autovetores do genótipo e da interação GxA.

A Manova foi realizada para a obtenção da matriz de variâncias e covariâncias entre as variáveis utilizadas no cálculo de distâncias genéticas. Essa distância do genótipo à um genótipo ideal (ideótipo) foi considerada a variável que o representa e utilizada para a construção do gráfico biplot dos genótipos e ser usada para auxiliar na seleção.

Para ponderar o efeito das variáveis utilizadas na elaboração do índice de seleção multivariado e aumentar a confiança na seleção de progênies foi realizada a análise *genotype by trait Biplot* (Figura 7). Os componentes principais utilizados na construção da figura representam 87,98% da variação dos dados. De acordo com YANG et al. (2009), o gráfico deve representar pelo menos 60% da variação dos dados, permitindo uma interpretação mais clara da contribuição das variáveis na construção do índice.

As sete características avaliadas no presente estudo se dividiram em três grupos e a ordem de relevância dos grupos de variáveis na construção do índice de seleção é de acordo com o peso das mesmas nos componentes 1 e 2. O primeiro é representado pelas variáveis produtividade (PROD), nota de sanidade (NS) e massa de cem grãos (MCG). O segundo grupo foi composto pelas variáveis comprimento de espiga (CE), altura de plantas (AP) e diâmetro de colmo (DC). O terceiro é representado pelo intervalo de florescimento (IF) da planta. As variáveis PROD, NP e MCG foram as que mais contribuíram para a construção do índice, seguidas dos parâmetros AP, DC e CE. A característica IF (intervalo de florescimento) apresentou baixa variação, conseqüentemente não influenciando na discriminação dos genótipos como as variáveis nos primeiros grupos formados.

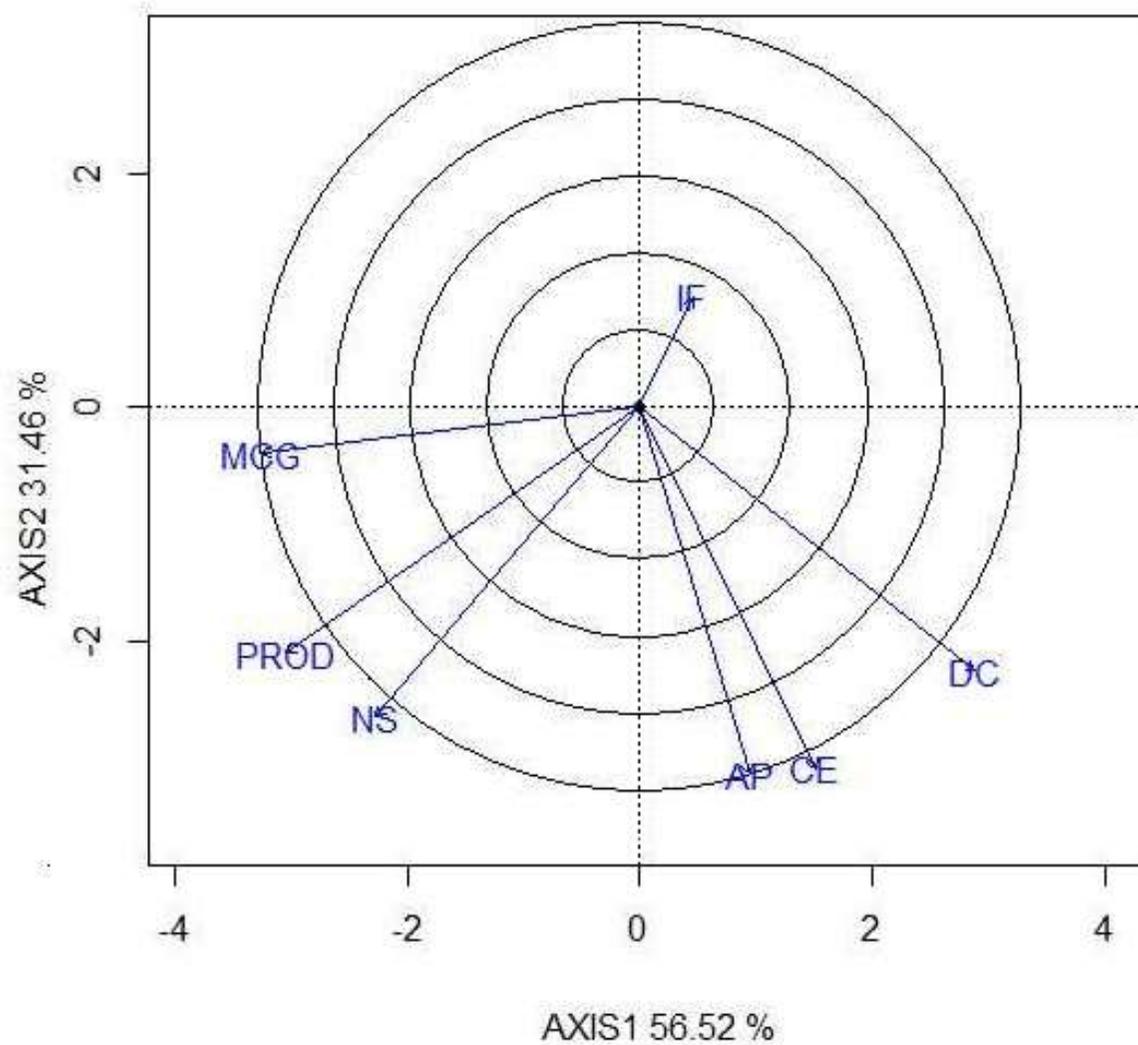


Figura 7. GT *Biplot* representando a relação entre as variáveis AP: altura de plantas (em metros); CE: comprimento de espiga (em cm); DC: diâmetro de colmo (em cm); IF: intervalo de florescimento (em dias); MCG: massa de cem grãos (em g); NS: nota de sanidade (de 1 a 5);

PROD: produtividade (em kg ha⁻¹ corrigida para 13% de umidade no grão) avaliadas no experimento.

Para selecionar genótipos, foram levadas em consideração as médias fenotípicas de produtividade e os valores do índice de distância ao ideótipo dos mesmos. As médias de produtividade bem como seus respectivos valores para o índice nos quatro ambientes, estão dispostas na Tabela 4. O Rank de genótipos foi ordenado em função do aporte de produtividade dos genótipos com a inoculação da bactéria. Na tabela 4 estão os dez genótipos que apresentaram maior aumento de produtividade quando inoculados e os dez com menor aumento, que no caso diminuíram produtividade quando receberam o tratamento com a bactéria.

Tabela 4. Rank de produtividade (PROD) e índice de seleção distância ideótipo-genótipo (ISDI) dos dez genótipos (GEN) mais e menos produtivos avaliados em quatro ambientes em 2018.

RANK	GEN	PROD*	ISDI*
1°	256	4420 a	980 c
2°	241	4284 a	1013 b
3°	246	4052 b	1012 b
4°	234	4003 b	1004 b
5°	244	3971 b	1027 a
6°	217	3962 b	1005 b
7°	215	3959 b	957 d
8°	211	3921 b	975 c
9°	224	3895 c	1035 a
10°	206	3881 c	1003 b
247°	154	1939 r	672 i
248°	66	1932 r	831 f
249°	59	1913 r	960 d
250°	176	1854 s	726 h
251°	85	1814 s	882 e

252°	96	1782 t	690 i
253°	98	1745 t	703 i
254°	88	1584 u	827 f
255°	90	1500 u	693 i
256°	92	1498 u	673 i

* médias dos quatro ambientes; letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Skott-knott a 5% de probabilidade.

O híbrido simples adaptado para a região do MS, genótipo nº 256 e a progênie 241 foram os que estatisticamente apresentaram as maiores médias de produtividade, porém seus valores no ISDI não foram os maiores. A progênie 241 apresentou maior nota que o híbrido no índice, mostrando ser promissora e importante para o programa de melhoramento. As progênies 244 e 224 apresentaram desempenho ideal para o presente estudo quanto ao ISDI enquanto apresentaram produtividade dentro das três maiores estatisticamente, se tornando importantes para o presente estudo juntamente com a 241.

Levando as condições experimentais em consideração, os genótipos foram produtivos. Com a restrição de nitrogênio utilizada no presente estudo, o teto de produtividade esperado dos genótipos era de 4.500 kg ha⁻¹ (RAIJ, 1991). Em adição, a semeadura tardia dos experimentos afeta negativamente a produtividade do milho, uma vez que em escassez de água, a planta tende a fechar seus estômatos na tentativa de impedir a saída da mesma para a atmosfera, acarretando em processos fisiológicos antagonistas à produtividade, como a fotorrespiração (MEDICI et al., 2007).

Levando em consideração apenas as médias de produtividade, 37 progênies apresentaram aumento de produtividade quando inoculadas com *Azospirillum brasiliense* nos dois municípios de avaliação. Os números das progênies foram 22, 104, 114, 122, 124, 142, 201, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 220, 221, 222, 223, 224, 229, 230, 231, 233, 236, 241, 243, 244, 247 e a 248. O segundo parâmetro considerado para a seleção é observar o desempenho dos genótipos no gráfico *Biplot* construído com o ISDI.

Pesquisas com *Azospirillum* em *Z. mays* L. tornaram-se importantes a partir da década de 80, com estudos de Albrecht et al. (1981). Inicialmente, isolou-se a bactéria que foi inoculada em plântulas de milho esterilizadas em casa de vegetação, ao mesmo tempo que também se

avaliou essa interação em experimentos a nível de campo com *Z. Mays* inoculado e não inoculado. Por mais que os autores concluíram não encontrar benefício para a planta, foi observado efeito significativo da enzima nitrogenase e do conteúdo de nitrogênio na planta de milho que incentivou a continuação desses estudos.

Diferente desse exemplo, a inoculação da bactéria no presente estudo fez as condições do ambiente em Dourados se alterarem com bastante intensidade quando se observa os vetores dos ambientes Dourados Inoculado (DI) e Dourados Não inoculado (DN) (Figura 8). Desta forma, uma avaliação de representatividade dos ambientes de avaliação, bem como a capacidade de discriminação de genótipos de cada ambiente é interessante.

O vetor DI se afastou do vetor DN, enquanto os vetores de CI e CN continuam próximos. Segundo Yan & Tinker (2006), quando dois vetores estão aproximados, os ambientes tem positiva correlação genética. O ângulo formado entre os vetores DI e DN é maior que o ângulo entre os vetores CI e CN, inferindo que a correlação entre os ambientes em Dourados é mais fraca que entre os ambientes de Caarapó.

Na segunda quinzena de abril, as condições ambientais dos experimentos não estavam favoráveis quanto a disponibilidade de água, tanto pela umidade relativa quanto pelo acúmulo de pluviosidade (Figura 5 e 6). Nesse período, as plantas de milho em Dourados estavam com 30 DAE e 5 a 7 folhas expandidas, estágio fenológico importante para a definição de componentes de produção da cultura (FANCELLI & DOURADO NETO, 2000; BERGAMASCHI et al., 2010).

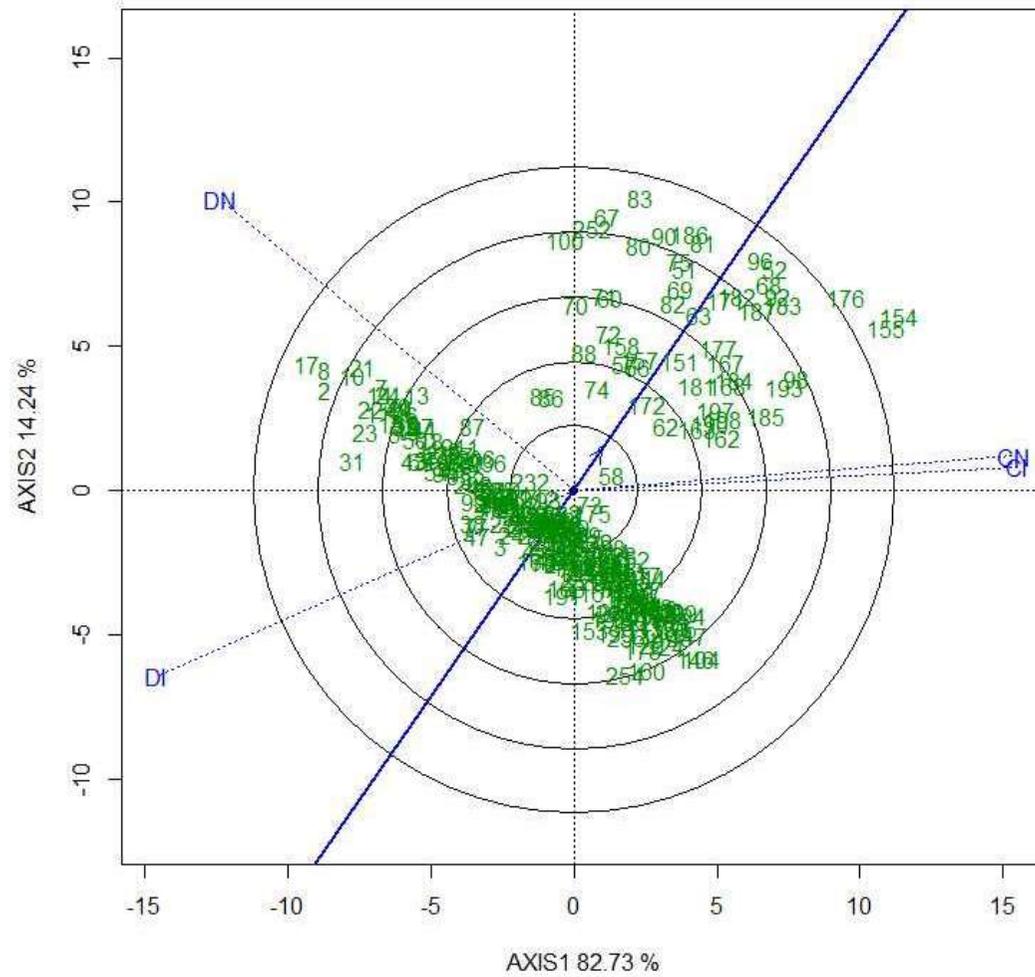


Figura 8. GGE *Biplot* de discriminação e representatividade dos ambientes para o índice de seleção distância ideótipo-genótipo de 256 genótipos avaliados em Dourados inoculado (DI), Dourados não inoculado (DN), Caarapó inoculado (CI) e Caarapó não inoculado (CN).

Devido a diferença de 12 dias entre a data de semeadura dos experimentos, em Caarapó os genótipos atingiram mesmo estágio

fenológico aproximadamente no dia 27 de abril, época em que a pluviosidade e umidade relativa estavam favoráveis para as plantas (Figura 6). Foi observado que a inoculação em milho com espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Azospirillum* aumentam a tolerância da planta à estresse hídrico devido à um maior controle da pressão osmótica (CURÁ et al., 2017). A inoculação de *Azospirillum* no ambiente de Dourados pode ter auxiliado os genótipos nesse estágio importante para a produção causando essa diferença entre ambientes que não é observada no município de Caarapó devido a essa diferença de condições climatológicas entre os ambientes.

A inoculação do *Azospirillum* em milho vai além da fixação de nitrogênio para as raízes das plantas, as bactérias sintetizam hormônios vegetais que interferem no desenvolvimento da planta e protegem as raízes contra organismos patogênicos no microbioma da rizosfera (SOUZA et al., 2017). A disponibilidade de *Azospirillum* no ambiente de Dourados pode ter aumentado a dependência dos genótipos pelos efeitos da inoculação uma vez que o revolvimento do solo pode ter diminuído a competição com indivíduos nativos. Esses benefícios podem ter colaborado para aumento do ângulo entre os vetores DI e DN. Enquanto no município de Caarapó, a ausência de revolvimento do solo não afeta a biomassa microbiana nativa, podendo ter contribuído para menor dependência da planta à inoculação com *Azospirillum brasiliense*.

As letras em azul ao final das linhas pontilhadas (Figura 8) representam o vetor de efeitos dos locais de avaliação. A linha azul forte que traça o gráfico é o Eixo do Ambiente-Médio (EAM) e representa a média geral dos ambientes. Quanto menor o ângulo entre um ambiente e o eixo médio, maior é a representatividade do ambiente e quanto maior for o vetor desse ambiente, maior é a capacidade de discriminação de genótipos adaptados (YAN & TINKER, 2006). É possível observar que CN e CI apresentam ângulo menor que DI e DN em comparação ao EAM, logo são mais representativos e tem semelhante capacidade de discriminar genótipos por terem comprimento muito próximo.

Para continuar a seleção de genótipos, previamente feita pelas médias de produtividade, foi utilizada a análise GGE *Biplot* “quem venceu onde”, da Figura 9. A análise é uma forma de visualizar padrões de interação GxA, bem como criar mega-ambientes (de correlação positiva) e identificar genótipos mais adequados para cada ambiente. Os dados dos componentes 1 e 2, foram utilizados no eixo X e Y respectivamente e conseguem expressar 96,97% da variância total dos dados.

Ao conectar os genótipos mais distantes da origem com uma linha, observamos a formação de um polígono que tem nos seus vértices os

genótipos de maior ou menor desempenho (Figura 9). As linhas vermelhas são linhas perpendiculares de igualdade entre genótipos nos vértices do polígono. Essas linhas dividem o *Biplot* em setores, sendo o genótipo presente no vértice do setor o vencedor nesse setor. Conforme ilustrado, percebe-se que enquanto o *Biplot* produz sete setores, os ambientes se dividem em dois deles.

Na Figura 9, pode-se observar a formação de dois mega ambientes, onde cada um deles é representado exatamente pelos municípios de avaliação do presente estudo. Esses ambientes apresentam correlação positiva e formam um mega ambiente por estarem no mesmo setor. Os genótipos que estiverem nos setores formadores de um mega ambiente são de boa adaptabilidade (YAN & TINKER, 2006). No caso de não haverem vetores representando algum ambiente de avaliação no setor, o genótipo do vértice não é adequado para nenhum ambiente. Por exemplo a linha vermelha que fica entre os genótipos 154 e 83 indica que o 154 teve maior desempenho no setor com os locais CI e CN, já o 83 não apresentou bom desempenho em ambiente algum.

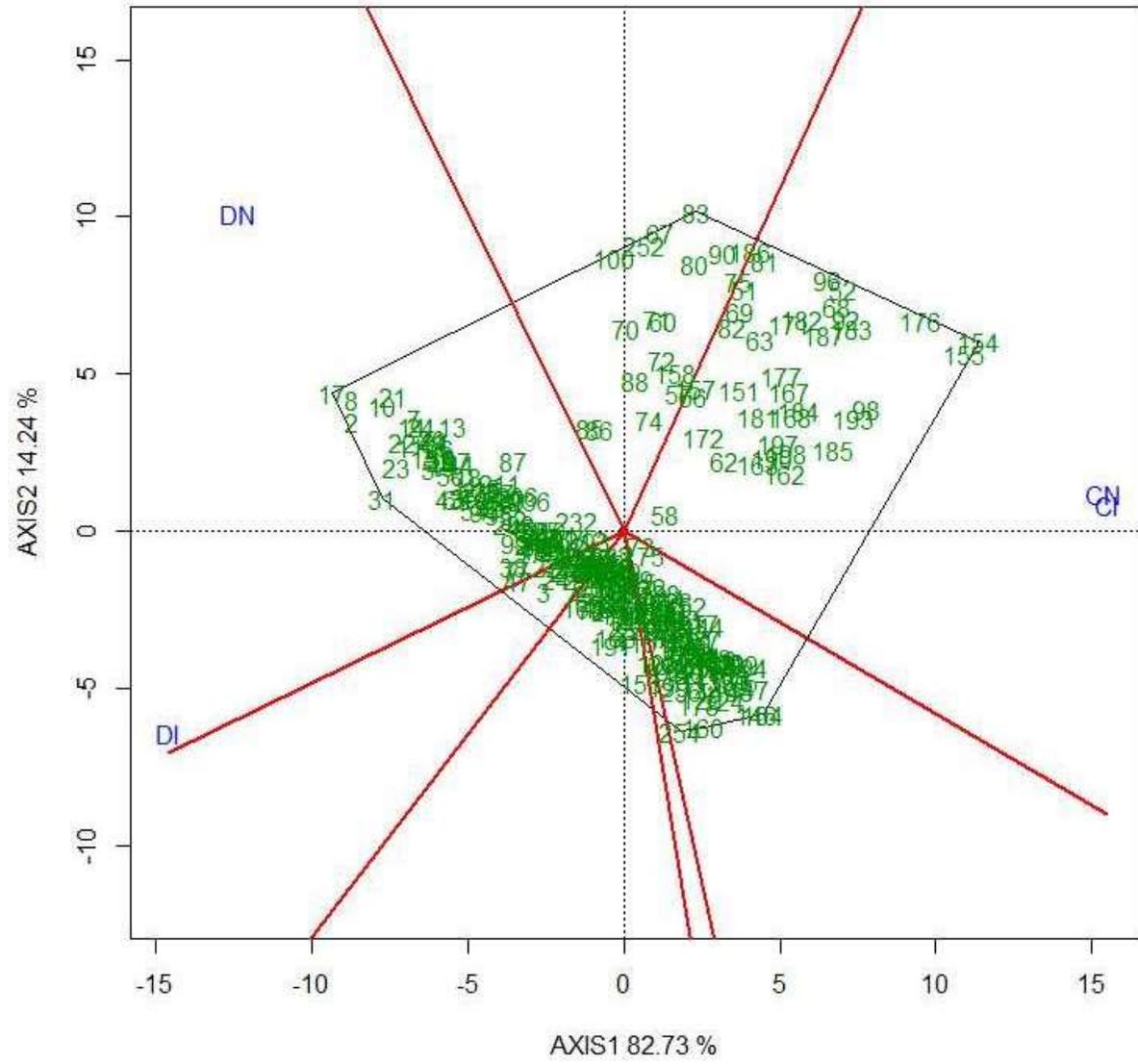


Figura 9. GGE *Biplot* representando o gráfico "quem venceu onde" (which won where) para o índice de seleção distância ideótipo-genótipo de 256 genótipos avaliados em Dourados inoculado (DI), Dourados não inoculado (DN), Caarapó inoculado (CI) e Caarapó não inoculado.

Nesse caso, as progênies 83, 146 (de difícil visualização devido ao elevado número de genótipos na figura) e 160 foram as de pior desempenho quanto ao ISDI por estarem nos vértices de setores do polígono sem vetores de ambientes. Os genótipos localizados nesses setores que não representam ambiente algum, consistem em indivíduos de baixa adaptabilidade e estabilidade. Uma possível explicação para o desempenho dessas progênies é a própria genética do material: progênies de meios-irmãos (OKOYE et al., 2018). Por não saber qual o material fornecedor do pólen para a formação dessas progênies, sua genética não é garantida de bom desempenho antes de testes a campo com o do presente estudo.

Na Tabela 4, observa-se que os genótipos mais produtivos não são os mesmos com maior valor no índice. A seleção baseada no índice leva em maior consideração as variáveis com maior peso nos CP 1 e 2 da análise GT *Biplot* (Figura 7), logo a sanidade observada nas plantas durante o florescimento e a massa de cem grãos foram as variáveis que mais influenciaram nessa diferença de posição.

A visualização de índices de seleção em gráficos *biplots* para estudar adaptabilidade e estabilidade de genótipos não seleciona apenas genótipos de maior produtividade (OLIVEIRA et al., 2014), evidenciando a importância do uso da estatística multivariada. Entretanto, pelo rank de genótipos no índice de seleção (Tabela 4), o genótipo 256, mais produtivo no presente estudo, ficou estatisticamente em terceiro lugar enquanto o genótipo com melhor desempenho no índice produziu em média 449 kg ha⁻¹ a menos.

O índice de seleção subestimou a produtividade de alguns genótipos, característica importante em milho. Tal resultado já foi observado e a decisão foi de combinar o índice com as médias de produtividade (KUMAR et al., 2016), evidenciando que a seleção apenas pelo índice não é parâmetro suficiente.

Para tal seleção combinada, a visualização de qual genótipo foi mais adaptado para qual mega ambiente foi feita de um em um utilizando uma ferramenta no programa R. Após contabilização do número de progênies nos mega ambientes, observa-se que 38 delas estiveram no mega ambiente de Caarapó, enquanto 47 estiveram no mega ambiente de Dourados. Quando a produtividade dos genótipos em função da inoculação era o único parâmetro para a seleção, 37 progênies tiveram aporte de produtividade quando inoculadas nos dois locais de avaliação. Entretanto,

utilizando o índice de seleção por meio do gráfico GGE *biplot*, apenas 29 delas continuam selecionadas como de eficiente associação com a bactéria. Essa utilização de dois parâmetros torna mais fidedigno o resultado da seleção.

Das 29 progênes de meios-irmãos que foram selecionadas, uma tem como genitor feminino o genótipo 251, uma variedade de polinização aberta. Cinco delas vieram do genótipo 253, também uma variedade de polinização aberta. As 23 remanescentes são progênes do genótipo 255, um híbrido simples. Combinando a seleção por meio das médias de produtividade e do índice de seleção, 11,6% das progênes foram selecionadas.

O híbrido simples adaptado à região, o genótipo 256, foi o mais produtivo. Os outros nove genótipos mais produtivos foram progênes que tiveram o genótipo 255 como genitor feminino. Em termos de produtividade, o genótipo 255 teve média de 3.036 kg ha⁻¹ com a inoculação, enquanto a das suas progênes foi 206 kg ha⁻¹ maior (3.239 kg ha⁻¹).

Por outro lado, o genótipo 254, outro parental híbrido, teve produtividade média de 2.325 kg ha⁻¹ no experimento enquanto suas 50 progênes tiveram média de produtividade semelhante; 2.360 kg ha⁻¹. Dentre as progênes selecionadas no programa de melhoramento para eficiente interação com bactérias fixadoras de nitrogênio, 80% têm o genótipo 255 como genitor feminino, evidenciando que o material genético apresentou maior capacidade de gerar progênes de eficiente interação com a bactéria nesse estudo.

Estudos em outras culturas como a soja e a mandioca têm mostrado que o nitrogênio disponibilizado por bactérias diazotróficas pode suprir parcialmente a adubação nitrogenada química (HRIDYA et al., 2012; SHAKERI et al., 2015). Isso porque a especificidade da bactéria com espécies vegetais é ampla por motivos de adaptação genética, fazendo com que a interação da *Azospirillum brasiliense* com o milho não seja tão específica ou capaz de fornecer todo nutriente à planta (HUNGRIA et al., 2010). Desta forma, a combinação do índice multivariado com o gráfico GGE-*Biplot* permitiu aumento da especificidade desses genótipos com a bactéria, reduzindo sua dependência de fertilizantes industriais e um passo mais próximo da sustentabilidade.

4. CONCLUSÕES

Foram selecionadas 29 progênies de eficiente associação com *Azospirillum brasiliense*. A seleção de genótipos por meio do índice de seleção distância genótipo-ideótipo subestimou indivíduos de alta produtividade. A seleção por meio das médias de produtividade com a visualização do gráfico GGE-*Biplot* permitiu seleção de genótipos produtivos, estáveis e de eficiente associação com a bactéria.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBRECHT, S. L., OKON, Y., LONNQUIST, J., & BURRIS, R. H. Nitrogen fixation by corn-*Azospirillum* associations in a temperate climate. **Crop Science**, v.21, n.2, p.301-306, 1981.
- ARAUJO, K. C.; VIVAS, M. Multivariate analysis used as a tool to select snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. **Australian Journal of Crop Science**, v.12, n.1, p.67-76, 2018.
- ARAÚJO, L.B.; NUALLES, M. V.; ARAUJO, M. F. C.; DIAS, C. T. S. Gráficos biplot e joint plot para o estudo da interação tripla. **Ciência Rural**, v.40, n. 4, p.833-839, 2010.
- BERGAMASCHI, H.; DALMAGO, G. A.; COMIRAN, F.; BERGONCI, J. I.; MÜLLER, A. G.; FRANÇA, S.; PEREIRA, P. G. Déficit hídrico e produtividade na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.2, p.243-249, 2006.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Primeiro levantamento. v. 6 - safra 2018/19. ISSN: 2318-6852. Outubro de 2018. Brasília. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em: 1 nov. 2018.
- CROSSA, Jose. **Statistical analyses of multilocation trials**. In: Advances in agronomy. Academic Press, V.44, p.55-85, 1990.
- CURÁ, J. A.; FRANZ, D. R.; FILOSOFÍA, J. E.; BALESTRASSE, K. B.; BURGUEÑO, L. E. Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. Bacteria Increases the Tolerance of Maize to Drought Stress. **Microorganisms**. v.5, n.3, p.41, 2017.
- DE QUADROS, P. D.; ROESCH, L. F. W.; SILVA, P. R. F.; VIEIRA, V. M.; ROEHRS, D. D.; CAMARGO, F. A. O. Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v.61, n.2, p.209-218, 2014.
- FERREIRA, D. F. Análise de variância multivariada. In **Estatística Multivariada**, v.2, p.219-232, UFLA, Lavras, Brazil, 1996.
- HRIDYA, A.C.; BYJU, G.; MISRA, R. S. Effect of biocontrol agents and biofertilizers on root rot, yield, harvest index and nutrient uptake of cassava (*Manihot esculanta* Crantz). **Archives of Agronomy and Soil Science**. v.59, n.9, p.1215-1227, 2012.

- 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 and Soil**, v.331, n.1, p.413-425, 2010.
- KUMAR, B.; GULERIA, S. K.; KHANORKAR, S. M.; DUBEY, R. B.; PATEL, J.; KUMAR, V.; DAS, A. Selection indices to identify maize (*Zea mays* L.) hybrids adapted under drought-stress and drought-free conditions in a tropical climate. **Crop and Pasture Science**, v.67, n.10, p.1087-1095, 2016.
- LONGHINI, V. Z.; ANDREOTTI, M.; DE SOUZA, W. C. R.; COSTA, N. R.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; MONTANARI, R. Nitrogen fertilization and inoculation with diazotrophic bacteria in corn intercropped with xaraés grass. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.12, n.3, p.340-347, 2017.
- MEDICI, L. O.; AZEVEDO, R. A.; CANELLAS, L. P.; MACHADO, A. T.; PIMENTEL, C. Stomatal conductance of maize under water and nitrogen deficits. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.4, 599-601, 2007.
- MENDES, L. W.; KURAMAE, E. E.; NAVARRETE, A. A.; VAN VEEN, J. A.; TSAI, S. M. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. **The ISME journal**, v.8, n.8, p.1577-1583, 2014.
- OKOYE, N. F.; OLUWARANTI, A.; FAKOREDE, M. A. B.; AKINWALE, R. O. Seed Production, Growth and Grain Yield of Self, Half-sib and Bulk-sib Progenies Developed from an Early-maturing Maize (*Zea mays* L.) Population. **Asian Research Journal of Agriculture**, p.1-12, 2018.
- OLIVEIRA, R. L. De; PINHO, R. G. V.; FERREIRA, D. F.; PIRES, L. P. M.; MELO, W. M. C. Selection index in the study of adaptability and stability in maize. **The Scientific World Journal**, v.2014, p.1-6, 2014.
- OLIVEIRA, T. R. A. D.; GRAVINA, G. D. A.; OLIVEIRA, G. H. F. D.; ARAÚJO, K. C.; ARAÚJO, L. C. D.; DAHER, R. F.; CRUZ, D. P. D. The GT biplot analysis of green bean traits. **Ciência Rural**, v.48, n.6, p.2017-0757, 2018.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2018.
- RAIJ, Bernardo Van. Nitrogênio. In: RAIJ, Bernardo Van. **Fertilidade do solo e adubação**. São Paulo; Piracicaba: Editora Agronômica Ceres, p.343, 1991.

- RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P.; SOUZA, E. A.; GONÇALVES, F. M. A.; SOUZA, J. C. **Genética na Agropecuária**, ed.5, Ufla-MG, p.565, 2012.
- SHAKERI, E.; SEYED, A. M. M. S.; DEHAGHI, M. A.; TABATABAEI, S.A.; MEHRDAD MORADI-GHAHDERIJANI. Improvement of yield, yield components and oil quality in sesame (*Sesamum indicum* L.) by N-fixing bacteria fertilizers and urea. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v.62, n.4, p.547-560, 2015.
- SOUZA, D. M.G.; LOBATO, E. **Cerrado: correção do solo e adubação**. Planaltina: Embrapa Cerrados, v.2, p.416, 2004.
- SOUZA, M. S.; DE BAURA, V. A.; SANTOS, S. A.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I.; JUNIOR, F. B. R.; MARQUES, M. R.; DA SILVA BRASIL, M. *Azospirillum spp.* from native forage grasses in Brazilian Pantanal floodplain: biodiversity and plant growth promotion potential. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.33, n.4, p.81-88, 2017.
- SUN, J.; VAN DOMMELEN, A.; VAN IMPE, J.; VANDERLEYDEN, J. Involvement of *glnB*, *glnZ*, and *glnD* genes in the regulation of poly-3-hydroxybutyrate biosynthesis by ammonia in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Applied Environmental Microbiology**, v.68, n.2, p.985-988, 2002.
- USDA. United States Department of Agriculture. World Agricultural Production. Circular series. 2018. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>. Acesso em: 01 dez. 2018.
- VILELA, F. O.; JÚNIOR, A. T. A.; PEREIRA, M. G.; SCAPIM, C. A.; VIANA, A. P.; JÚNIOR, S. D. P. F. Efeito da Seleção Recorrente na População UNB-2U de Milho Pipoca por Marcadores RAPD. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.30, n.1, p.25-30, 2008.
- WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**. Springer, New York, 2009.
- YAN, W.; HUNT, L. A.; SHENG, Q.; SZLAVNICS, Z. Cultivar evaluation and mega-environment investigation based on the GGE biplot. **Crop Science**, v.40, n.3, p.597-605. 2000.
- YAN, W.; TINKER, N. A. Biplot analysis of multi-environment trial data: Principles and applications. **Canadian Journal of Plant Science**, v.86, n.3, p.623-645, 2006.

YANG, R. C.; CROSSA, J.; CORNELIUS, P. L.; BURGUEÑO, J. Biplot analysis of genotype× environment interaction: Proceed with caution. **Crop Science**, v.49, n.5, p.1564-1576, 2009.

CONCLUSÃO GERAL

A inoculação de milho com bactérias do gênero *Azospirillum brasiliense* é uma tecnologia que pode aumentar a produção de milho de forma sustentável contando que o genótipo de milho deve responder positivamente à presença da bactéria e que a adubação química de fertilizantes nitrogenados venha a complementar a nutrição da planta juntamente com o nitrogênio fixado pela bactéria.