

Efeito da Inoculação de *Azospirillum brasilense* AbV5 em Híbridos de Milho de Um Dialelo Parcial.

Alessandra Koltun¹, Alana Padia Cavalcante¹, Andressa Camila Seiko Nakagawa¹, Heitor Augusto Carvalho Dias¹, Karla Bianca de Almeida Lopes¹, Matheus Dalsente Krause¹, Paulo Gabriel Dalto¹, Robson Rockembacher¹, Thiago Pablo Marino¹, André Luiz Martinez de oliveira¹, e Josué Maldonado Ferreira²

^{1,2}Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR ²josuemf@uel.br

RESUMO - Uma das estratégias para aumentar a produtividade da cultura do milho, com uma melhor relação custo/benefício e um menor impacto ambiental, é o uso da inoculação de rizobactérias. O objetivo deste trabalho foi estimar o efeito da capacidade combinatória de linhagens de milho e verificar suas interações com a rizobactéria *Azospirillum brasilense* AbV5. Foram avaliados 27 genótipos utilizando o delineamento experimental em blocos casualizados. As parcelas foram constituídas de tratamentos com ou sem inoculação com três repetições, e nas subparcelas foram sorteados os 27 genótipos de milho. Os experimentos foram conduzidos na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina. Os parâmetros avaliados foram: produtividade de grãos, diâmetro de espiga, porcentagem de espigas danificadas, dias para florescimento e altura de planta. Foi constatado o efeito do inóculo para a redução da porcentagem de espigas danificadas, entretanto os genótipos avaliados não apresentam interação com o inóculo. Observou-se também que os quadrados médios para a CGC foram maiores que os da CEC o que é um indicativo da predominância dos efeitos aditivos dos genes. As linhagens L₃, L₆, L₁₁ e T₂ são as que apresentam as melhores estimativas de capacidade geral de combinação para produtividade e demais características, produzindo as melhores combinações híbridas.

Palavras-chave: *Zea mays* L., Adubação nitrogenada, Bactérias promotoras do crescimento vegetal, Melhoramento genético, Capacidade combinatória.

Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é um dos vegetais mais importantes para a humanidade, devido às diversas formas de sua utilização na alimentação humana e animal, *in natura* e na indústria, principalmente pela qualidade e pela quantidade de substâncias de reserva de seus grãos (ROCHA et al., 2011).

Uma das estratégias para aumentar a produtividade, com uma melhor relação custo/benefício e um menor impacto ambiental, é o uso da tecnologia de inoculação com rizobactérias promotoras do crescimento vegetal. Entre essas bactérias, as diazotróficas destacam-se, como as do gênero *Azospirillum*, principalmente em relação à cultura do milho (BASHAN et al., 2004). Os mecanismos de promoção de crescimento vegetal incluem ações diretas como a fixação biológica de nitrogênio (TAIZ e ZIEGER, 2004), produção de reguladores de crescimento vegetal (BASHAN e HOLGUIN, 1997), solubilização de fosfato inorgânico (BLOEMBERG e LUGTENBERG, 2001) e ações indiretas como o controle

biológico, produção de sideróforos e indução de resistência sistêmica no hospedeiro (HARMAN et al., 2004).

O sucesso da inoculação de plantas não leguminosas com rizobactérias depende de fatores ambientais, nutricionais e também da compatibilidade entre os pares envolvidos na interação (KIPE-NOLT et al., 1985). Assim, a seleção de genótipos vegetais favoráveis a essa associação é de extrema importância para que esta seja uma alternativa viável. Métodos de melhoramento genético que favoreçam essa empreitada são fundamentais para a concretização dessa tecnologia.

O dialelo é um método genético-estatístico que auxilia na seleção de genitores, com base na capacidade de combinação relacionada à produtividade e outras características fitotécnicas em populações segregantes. O uso do dialelo permite, ainda, conhecer o controle genético dessas características, que orienta o método de melhoramento a ser adotado (RAMALHO et al., 1993; CRUZ e REGAZZI, 1994).

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi determinar, mediante cruzamento dialético parcial, a capacidade geral (CGC) e específica (CEC) de combinação de doze linhagens de milho através de componentes de produção de seus híbridos, e a interação destes com a rizobactéria *Azospirillum brasilense* estirpe Abv5.

Material e Métodos

Foram avaliados 27 genótipos (24 híbridos experimentais de um dialelo parcial; a variedade ST0509 da UEL e os híbridos comerciais DKB 390 e DKB 390H da Monsanto), utilizando o delineamento experimental de blocos casualizados com parcelas subdivididas. As parcelas foram constituídas de tratamentos com ou sem inoculação com três repetições, e nas subparcelas foram sorteados os 27 genótipos de milho. Os híbridos experimentais foram desenvolvidos pelo Programa de Melhoramento Genético de Milho do Departamento de Biologia da UEL, a partir de cruzamentos dialéticos parciais incompletos entre três linhagens testadoras (T₁, T₂ e T₃) obtidas do sintético ST06 e doze linhagens (L₁ a L₁₂) obtidas do sintético ST20.

Os experimentos foram conduzidos na área experimental da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina, localizada na região Norte do Estado do Paraná (23°19'19"S e 51°12'04"W, com 580 m de altitude), durante a safra agrícola 2011/2012. A semeadura foi realizada manualmente no dia 27/10/2011, utilizando-se 30 sementes por fileira de 4 metros, no espaçamento de 0,80 m entre fileiras e 0,20 m entre covas. A densidade final

foi de 20 plantas por fileira após o desbaste. O controle de plantas daninhas foi efetuado por capina manual, e o de lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) foi realizada segundo as recomendações técnicas para a cultura.

O inoculante foi preparado com a estirpe AbV5 da bactéria *Azospirillum brasilense*, aplicado com bomba de aspersão (costal) na dose de 30 ml de calda por metro linear no 7º dia após a emergência das plântulas, com jato dirigido sobre a fileira. A concentração final de 3×10^7 células por mL de calda aplicada foi obtida pela diluição de 30 mL do inoculante por litro de água de abastecimento público.

As características avaliadas foram: produtividade de grãos (PGC, em $t\ ha^{-1}$), corrigida para grau de umidade igual a 13,5% e estande ideal, pela metodologia de covariância apresentada por Vencovsky e Barriga (1992), com valor extrapolado para a um hectare; diâmetro de espiga (DE, em cm); porcentagem de espigas danificadas (%ED), dias para florescimento (FL) e altura de planta (AP, em cm). Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o programa do *Statistical Analysis System* (SAS) e o teste de médias foi realizado segundo o método de Scott-Knott, em nível de significância de 5%, por meio do programa GENES.

As análises individuais de variâncias foram realizadas com a decomposição dos efeitos de genótipos em efeitos de testemunhas (T), híbridos experimentais (H) e no contraste T vs H. Os graus de liberdade de híbridos experimentais foram desdobrados por meio da análise dialélica, segundo o método proposto por Griffing (1956), de acordo com o modelo: $Y_{ij} = m + g_i + g_j + s_{ij} + \bar{e}_{ij}$, onde: Y_{ij} é o valor médio da combinação híbrida da linhagem L_i com a linhagem testadora T_j ; m é a média geral das combinações híbridas; g_i e g_j são os efeitos da capacidade geral de combinação (CGC) da i -ésima linhagem L_i e j -ésima linhagem T_j , respectivamente; s_{ij} é o efeito da capacidade específica de combinação (CEC) para os cruzamentos entre os genitores de ordem i e j ; e \bar{e}_{ij} é o erro experimental médio.

A análise de variância do dialelo e as estimativas de g_i , g_j e s_{ij} foram realizadas por meio de álgebra de matrizes, empregando o modelo matricial $Y = X\beta + \epsilon$, onde: Y é o vetor dos dados de médias observadas para os híbridos experimentais; X é a matriz dos constantes com valores de 0 e 1 relacionados aos parâmetros m , g_i , g_j , e s_{ij} ; β é vetor dos parâmetros m , g_i , g_j , e s_{ij} e ϵ é o vetor representando o erro associado às médias (\bullet_{ij}).

Resultados e Discussão

A análise de variância revelou efeitos significativos para a inoculação com *Azospirillum* para diâmetro de espiga e porcentagem de espigas danificadas, sendo observada uma menor porcentagem de espigas danificadas, o que sugere uma redução do ataque de lagartas na espiga (Tabela 1). Contudo, não foram observadas interações significativas entre os diferentes genótipos avaliados e aplicação ou não do inóculo, por meio da pulverização das fileiras no estádio de plântula.

A decomposição dos efeitos de genótipos permitiu identificar diferenças significativas entre as testemunhas para todas as características avaliadas (Tabela 1). A menor produtividade de grãos (PGC) foi observada para a variedade ST0509 e a maior produtividade para o híbrido comercial DKB 390H (Tabela 2). Houve efeitos significativos de híbridos experimentais (H) para produtividade, diâmetro de espiga, dias para o florescimento e altura de planta, revelando um comportamento diferenciado destes genótipos (Tabela 1). Dentre os 24 híbridos experimentais avaliados, 13 não diferiram estatisticamente da testemunha DKB390 para produtividade de grãos e mostraram desempenho semelhante para as demais características, com destaque para $L_3 \times T_2$, $L_6 \times T_3$ e $L_{11} \times T_2$.

O contraste entre testemunhas e cultivares mostrou diferença significativa para florescimento e altura de planta, sendo que as plantas mais tardias foram a da variedade ST0509.

Houve diferença significativa para CGC das linhagens e das testadoras para produtividade, diâmetro de espiga e altura de planta, sendo ainda significativos os efeitos de CGC das linhagens testadas para florescimento. No geral, as linhagens L_3 , L_6 , L_{11} e T_2 são as que mostraram as melhores estimativas de CGC para produtividade e demais características, produzindo as melhores combinações híbridas (Tabela 1 e 3). Tais linhagens apresentam maior frequência de alelos favoráveis para as características em questão (CRUZ e VENCOVSKY, 1989). A CEC de combinação apresentou efeitos significativos apenas para o diâmetro de espigas. Observa-se também que os quadrados médios para a CGC foram maiores que os da CEC, o que é também um indicativo da predominância dos efeitos aditivos dos genes.

Conclusões

Existe efeito do inóculo para a redução da porcentagem de espigas danificadas.

Os genótipos avaliados não apresentam interação com o inóculo, utilizando a metodologia de aplicação direta sobre as fileiras das plântulas.

As linhagens L₃, L₆, L₁₁ e T₂ são as que apresentam as melhores estimativas de capacidade geral de combinação para produtividade e demais características, produzindo as melhores combinações híbridas.

Literatura Citada

BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. Azospirillum-plant relationships: Environmental and physiological advances. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 43, p. 103-121, 1997.

BLOEMBERG, G.V. & LUGTENBERG, B.J.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*. v. 4, p. 343-350, 2001.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa. Imprensa Universitária, 1994, p. 390.

CRUZ, C.D.; VENCOVSKY, R. Comparação de alguns métodos de análise dialélica. *Revista Brasileira de Genética*, Viçosa, v.12, n.2, p.425- 438, 1989.

GRIFFING, B. Concept of general specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Australian Journal of Biological Sciences*, Melbourne, v.9, p. 463-493, 1956.

HARMAN, G.E. Myth and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* v.84, n.4, p. 377–393, 2000.

KIPE-NOLT, J.A; AVALAKKI, U.K.; DART, P.J. Root exudation of sorghum and utilization of exudates by nitrogen-fixing bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.17, n.6, p.859-863, 1985.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; ZIMMERMANN, M.J.O. Genética quantitativa em plantas autógamas: aplicação ao melhoramento do feijoeiro. Goiânia: Editora da UFG, 1993, p. 271.

ROCHA DR; FORNASIER FILHO D; BARBOSA JC. 2011. Efeitos da densidade de plantas no rendimento comercial de espigas verdes de cultivares de milho. *Horticultura Brasileira* 29: 392-397.

TAIZ, L. & ZIEGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3º ed., Porto Alegre: Artemed, 2004, p. 719.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. Genética biométrica no fitomelhoramento. Riberão Preto; Sociedade Brasileira de Genética, p.496, 1992.

Tabela 1 - Quadrados médios, níveis de significância do teste F e médias gerais para produtividade de grãos (PGC, em t ha⁻¹); diâmetro de espiga (DE, em cm); porcentagem de espigas danificadas (%ED); dias para florescimento (FL) e altura de planta (AP, em cm) avaliados em Londrina, na safra 2011/2012.

| Fonte de Variação | Quadrados Médios e Nível de Significância | | | | | |
|------------------------------------|---|----------|----------|------------------|----------|----------|
| | GL | PGC | DE | %ED ^φ | FL | AP |
| Bloco | 2 | 0,4216ns | 0,0393ns | 200,39ns | 0,2917ns | 211,25ns |
| Inóculo | 1 | 0,0032ns | 0,0139* | 325,92* | 8,4506ns | 72,936ns |
| Erro (a) | 2 | 1,6471ns | 0,0006ns | 5,0407ns | 8,0201ns | 125,40ns |
| Genótipos | 26 | 6,1621ns | 0,1156** | 129,24ns | 15,046** | 986,62** |
| Testemunha (T) | 2 | 45,229** | 0,3822** | 439,50** | 42,181** | 1293,8** |
| Híbridos experimentais (H) | 23 | 3,0314** | 0,0971** | 102,55ns | 6,3188** | 905,53** |
| CGC-Linhagens | 11 | 2,6563** | 0,1243** | 113,02ns | 10,812** | 1626,6** |
| CGC-Testadores | 2 | 17,246** | 0,2292** | 56,187ns | 0,5375ns | 896,47** |
| CEC | 10 | 0,6013ns | 0,0409* | 100,30ns | 2,5231ns | 114,15ns |
| T vs H | 1 | 0,0340ns | 0,0065ns | 122,44ns | 161,50** | 2237,3** |
| Inóculo x Genótipos | 26 | 0,9174ns | 0,0239ns | 113,48ns | 2,3641ns | 98,612ns |
| Erro (b) | 104 | 0,8722 | 0,0190 | 83,099 | 2,6495 | 81,760 |
| CV%(a) | | 8,88 | 0,28 | 11,63 | 2,49 | 3,43 |
| CV%(b) | | 11,19 | 2,79 | 81,78 | 2,48 | 4,79 |
| Médias | | | | | | |
| Média dos genótipos sem inoculação | | 8,34 | 4,95 | 7,6 | 66 | 189 |
| Média dos genótipos com inoculação | | 8,35 | 4,93 | 5,2 | 65 | 188 |
| Média geral | | 8,35 | 4,9 | 11,2 | 65,7 | 188,7 |

ns, * e **: não significativo, significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente.

^φ = análise de variância com dados transformados para arco seno de (%ED/100)^{0,5}

Tabela 2 - Médias e estimativas de CEC dos híbridos experimentais (s_{ij}) para produtividade de grãos (PGC); diâmetro de espiga (DE); porcentagem de espigas danificadas (%ED); dias para florescimento (FL) e altura de planta (AP) avaliadas em Londrina, safra 2011/2012.

| Tratamentos | PGC ($t\ ha^{-1}$) | | DE (cm) | | %ED | | FL | | AP (cm) | |
|----------------------------------|----------------------|----------|---------|----------|-------|----------|-------|----------|---------|----------|
| | média | s_{ij} | média | s_{ij} | média | s_{ij} | média | s_{ij} | média | s_{ij} |
| L ₁ x T ₂ | 8,53b | 0,11 | 5,0a | -0,03 | 1,0b | -0,03 | 64,3c | -0,51 | 186c | 2,87 |
| L ₁ x T ₃ | 8,08b | -0,11 | 4,9a | 0,03 | 3,2b | 0,03 | 65,2c | 0,51 | 189c | -2,87 |
| L ₂ x T ₁ | 7,89b | 0,03 | 5,0a | -0,04 | 7,5a | -1,13 | 65,2c | 0,57 | 185c | 1,56 |
| L ₂ x T ₃ | 8,84b | -0,03 | 5,0a | 0,04 | 9,5a | 1,13 | 64,2c | -0,57 | 190c | -1,56 |
| L ₃ x T ₁ | 8,56b | -0,04 | 4,9b | -0,05 | 10,8a | 3,03 | 65,3c | -0,71 | 202b | 4,51 |
| L ₃ x T ₂ | 9,89b | 0,04 | 5,0a | 0,05 | 2,4b | -3,03 | 66,9b | 0,71 | 191c | -4,51 |
| L ₄ x T ₁ | 6,95c | -0,13 | 5,0a | 0,04 | 5,5b | -2,84 | 64,7c | -0,09 | 166d | 0,89 |
| L ₄ x T ₂ | 8,46b | 0,13 | 5,0a | -0,04 | 8,8a | 2,84 | 65,1c | 0,09 | 162d | -0,89 |
| L ₅ x T ₂ | 8,33b | -0,20 | 5,1a | 0,05 | 4,4b | 0,85 | 66,8b | -0,17 | 190c | -0,60 |
| L ₅ x T ₃ | 8,50b | 0,20 | 4,9b | -0,05 | 4,9b | -0,85 | 67,0b | 0,17 | 201b | 0,60 |
| L ₆ x T ₁ | 7,94b | -0,23 | 5,1a | 0,01 | 2,8b | -2,50 | 67,3b | 0,49 | 191c | -6,64 |
| L ₆ x T ₃ | 9,41b | 0,23 | 5,0a | -0,01 | 7,5a | 2,50 | 66,5b | -0,49 | 213a | 6,64 |
| L ₇ x T ₁ | 7,82b | 0,19 | 4,9a | 0,12 | 4,7b | -1,20 | 65,4c | -0,51 | 191c | -1,88 |
| L ₇ x T ₂ | 8,68b | -0,19 | 4,7c | -0,12 | 4,7b | 1,20 | 66,7b | 0,51 | 193c | 1,88 |
| L ₈ x T ₁ | 7,95b | 0,06 | 4,8b | -0,03 | 9,7a | -0,02 | 65,3c | 0,03 | 200b | 2,53 |
| L ₈ x T ₃ | 8,86b | -0,06 | 4,7c | 0,03 | 9,5a | 0,02 | 65,4c | -0,03 | 203b | -2,53 |
| L ₉ x T ₁ | 6,74c | -0,34 | 4,9b | -0,03 | 9,8a | 0,42 | 65,8b | 0,62 | 173d | 1,06 |
| L ₉ x T ₂ | 8,67b | 0,34 | 5,0a | 0,03 | 6,6a | -0,42 | 64,8c | -0,62 | 169d | -1,06 |
| L ₁₀ x T ₁ | 7,46c | 0,09 | 5,1a | 0,04 | 13,1a | 3,94 | 64,8c | -0,10 | 171d | -1,51 |
| L ₁₀ x T ₃ | 8,30b | -0,09 | 4,9b | -0,04 | 5,0b | -3,94 | 65,2c | 0,10 | 182c | 1,51 |
| L ₁₁ x T ₂ | 8,90b | -0,25 | 5,1a | 0,05 | 3,8b | -1,41 | 64,0c | -0,01 | 183c | 2,32 |
| L ₁₁ x T ₃ | 9,18b | 0,25 | 4,9b | -0,05 | 8,7a | 1,41 | 63,9c | 0,01 | 188c | -2,32 |
| L ₁₂ x T ₁ | 8,10b | 0,39 | 4,7c | -0,06 | 6,6b | 0,31 | 64,0c | -0,30 | 185c | -0,53 |
| L ₁₂ x T ₃ | 8,34b | -0,39 | 4,7c | 0,06 | 5,8b | -0,31 | 64,8c | 0,30 | 194c | 0,53 |
| DKB390 | 8,25b | --- | 5,1a | --- | 3,5b | --- | 67,2b | --- | 191c | --- |
| DKB390H | 11,08a | --- | 5,1a | --- | 0,6b | --- | 66,8b | --- | 191c | --- |
| ST0509 | 5,58d | --- | 4,7c | --- | 12,7a | --- | 71,6a | --- | 216a | --- |

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott & Knott, em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 3. Estimativas de CGC das linhagens provenientes do sintético ST20 (g_L) e as testadoras (g_T) provenientes do sintético ST06 para produtividade de grãos (PGC); diâmetro de espiga (DE); porcentagem de espigas danificadas (%ED); dias para florescimento (FL) e altura de planta (AP) avaliadas em Londrina, safra 2011/2012.

| Estimativas | PGC ($t\ ha^{-1}$) | DE (cm) | %ED | FL | AP (cm) |
|---|----------------------|---------|-------|-------|---------|
| Médias (m) | 8,40 | 4,94 | 6,40 | 65,36 | 187,26 |
| Estimativas de CGC das linhagens testadas (g_L) obtidas do sintético ST20 | | | | | |
| g_{L1} | -0,47 | 0,06 | -3,90 | -0,72 | -0,77 |
| g_{L2} | 0,21 | 0,08 | 1,32 | -0,64 | -1,80 |
| g_{L3} | 0,96 | -0,03 | 0,51 | 0,73 | 11,89 |
| g_{L4} | -0,56 | 0,00 | 1,05 | -0,48 | -20,33 |
| g_{L5} | -0,37 | 0,08 | -1,31 | 1,45 | 7,42 |
| g_{L6} | 0,52 | 0,16 | -2,00 | 1,61 | 12,78 |
| g_{L7} | -0,02 | -0,15 | -1,41 | 0,69 | 7,17 |
| g_{L8} | 0,25 | -0,14 | 2,47 | 0,07 | 11,95 |
| g_{L9} | -0,57 | -0,03 | 2,06 | -0,02 | -12,96 |
| g_{L10} | -0,28 | 0,06 | 1,87 | -0,30 | -12,64 |
| g_{L11} | 0,26 | 0,08 | 0,28 | -1,47 | -2,72 |
| g_{L12} | 0,06 | -0,17 | -0,94 | -0,93 | -0,01 |
| Estimativas de CGC das linhagens do sintético ST06 usadas como testadoras (g_T) | | | | | |
| g_{T1} | -0,75 | 0,02 | 0,87 | -0,13 | -2,01 |
| g_{T2} | 0,49 | 0,07 | -1,49 | 0,11 | -3,81 |
| g_{T3} | 0,26 | -0,09 | 0,62 | 0,01 | 5,82 |