



Qualidade fisiológica de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de trigo reinoculadas com bactérias diazotróficas⁽¹⁾

Vandeir Francisco Guimarães^(2*); Débora Kestring Klein⁽³⁾; Carol Galego Comar⁽⁴⁾; Leandro Rampim⁽³⁾; Luana Fernandes Tavares⁽⁴⁾; Aline Kelly Pomini de Souza⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos do CAPES/PNPD, CNPq, INCT-FBN, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Estado do Paraná, Fundação Araucária e à Unioeste/PPGA.

^(2*) Professor Adjunto na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, Bolsista de Produtividade em Pesquisa 2 do CNPq. E-mail: vandeirfg@yahoo.com.br;

⁽³⁾ Bolsista do PNPD - Programa Nacional de Pós-doutorado no Programa de Pós-Graduação stricto sensu em Agronomia - nível Mestrado e Doutorado, Campus de Marechal Cândido Rondon. E-mail: rampimleandro@yahoo.com.br; deborakestring@yahoo.com.br;

⁽⁴⁾ Estudante de Graduação na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon. E-mail: caroline.comar@outlook.com; luannaftavares@hotmail.com;

⁽⁵⁾ Estudante de Pós-graduação, Unioeste, Marechal Cândido Rondon, PR. E-mail: alinepomini@msn.com;

RESUMO: A reinoculação vem sendo testado para maximizar os parâmetros de fixação biológica do nitrogênio e promoção de crescimento. Assim, objetivou avaliar a qualidade fisiológica de sementes e o desenvolvimento inicial de plântulas de trigo reinoculadas com *Azospirillum brasilense*, provenientes de cultivo da safra 2014. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x4, com quatro repetições. O primeiro fator: ausência e presença de reinoculação com *A. brasilense* nas sementes colhidas no cultivo anterior (F2). O segundo fator, tipo de adubação no cultivo anterior: ausência de adubação à lanço + ausência de *A. brasilense* na semeadura; 120kg ha⁻¹ de N com ureia + *A. brasilense* na semeadura; ausência de fertilizante à lanço + *A. brasilense* na semeadura; e 120kg ha⁻¹ de N com fertilizante nitrogenado NET (Nitrogen Efficient Technology) + *A. brasilense* na semeadura. Foram quantificadas as variáveis morfológicas: comprimento da parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CR); diâmetro do coleto (DC); número de raízes (NR); volume de raízes (VR); além da massa seca da parte aérea e raiz. O CR e CPA das sementes que receberam inoculação apenas em F2 associadas com o fornecimento de 120 kg ha⁻¹ de N com fertilizante (NET) + *A. brasilense* apresentaram melhor desempenho comparadas aos demais tratamentos para ambas as variáveis. Conclui-se que a reinoculação se mostrou processo viável e adequado, não causando danos ao desenvolvimento das plântulas, e ainda, proporcionando melhorias principalmente ao sistema radicular.

Termos de indexação: *Triticum aestivum* L.; *Azospirillum brasilense*; adubação nitrogenada

INTRODUÇÃO

Na busca por alternativas que possam diminuir uso de nitrogênio, tem sido verificado resultado favoráveis com uso de bactérias diazotróficas

(Boddey & Döbereiner, 1995), sendo benéficas tanto pelo incremento na absorção de nutrientes do solo (Boddey et al., 1986), quanto pelo fornecimento de nitrogênio (N) (Hungria, 2011) e, na produção ou estímulo na síntese de hormônios/regulares vegetais que podem favorecer o crescimento das plantas (Iniguez et al., 2004).

Na cultura de trigo, a inoculação de *Azospirillum brasilense* tem incrementado o teor de N em grãos colhidos, assim como alteração na morfologia de raízes e parte aérea (Hungria, 2011).

A reinoculação é um método que vem sendo testado na busca de maximizar os parâmetros de fixação biológica do nitrogênio aliado a bactérias diazotróficas com o aumento de doses do inóculo. Assim, em busca de novos métodos, a inoculação de sementes obtidas de plantas (F2) que tiveram suas sementes inoculadas durante a semeadura, é uma alternativa que vem com a finalidade de elevar a concentração desses inóculos (Braga, 2012).

Portanto, o presente trabalho baseia-se na hipótese de que a utilização de *Azospirillum* pode intensificar as respostas quanto à promoção de crescimento e fixação de nitrogênio, ao utilizar sementes inoculadas no cultivo anterior, ou a reinoculação prejudique o desenvolvimento inicial, componentes de produção e produtividade, identificando formas de utilização de *Azospirillum* que proporcione repostas favoráveis, visto que altas doses de nitrogênio podem promover sementes de baixa qualidade devido presença de patógenos.

A possibilidade de ocorrer respostas positivas no desenvolvimento inicial das plântulas ao realizar a reinoculação de grãos de trigo pode promover a utilização de *Azospirillum* em campos de produção de semente de trigo ou, ao identificar problemas com a reinoculação, pode ser mais adequado inocular apenas campos de produção de sementes ou a possibilidade de ser mais vantajoso apenas realizar a inoculação pelo produtor de grãos, ou seja, identificando a maneira que tem respostas mais favoráveis. Quanto ao nitrogênio, pode ser



mais adequado utilizar as bactérias diazotróficas para fornecer parte do nitrogênio cultura de trigo sem causar danos fitossanitários. Diante do exposto, o presente trabalho objetivou avaliar a qualidade fisiológica de sementes e o desenvolvimento inicial de plântulas de trigo reinoculadas com *Azospirillum brasilense*, provenientes de cultivo da safra 2014, onde momento da semeadura as sementes foram submetidas à inoculação de *Azospirillum* e doses de fertilizantes nitrogenados.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, na Estação de Horticultura e Cultivo Protegido Professor Mário César Lopes, pertencente ao Núcleo de Estações Experimentais (NEE) da Universidade Estadual do Oeste Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon. O município está localizado na região Oeste do Estado do Paraná sob as coordenadas geográficas 24° 46' S e 54° 22' W e altitude média de 420 metros. O Clima local é classificado segundo Koppen do tipo Cfa, subtropical com chuvas bem distribuídas durante o ano e verões quentes entre 28 e 29°C e a temperatura anual entre 22 e 23°C.

O experimento foi instalado em delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x4, com quatro repetições, totalizando 32 unidades experimentais. O primeiro fator foi composto ausência e presença de reinoculação com *Azospirillum brasilense* nas sementes. Já o segundo fator foi composto por diferentes tipos de fertilizantes nitrogenados [com uréia e Nitrogen Eficient Technology (NET)]. Estes tratamentos foram originados do cultivo em ensaio anterior com os respectivos tipos de adubação: ausência de adubação à lanço + ausência de *A. brasilense* na semeadura (T1); 120 kg ha⁻¹ de N com ureia + *A. brasilense* na semeadura (T2); ausência de fertilizante à lanço + *A. brasilense* na semeadura (T3); e 120 kg ha⁻¹ de N com NET+ *A. brasilense* na semeadura (T4).

Primeiramente foram cultivadas a campo a cultivar de trigo CD150, na localidade de Marechal Cândido Rondon/PR, durante ensaio com doses e fontes nitrogenadas associada a inoculação de sementes com *A. brasilense*. Desta forma, neste trabalho, foi utilizado material vegetal (grãos-sementes) oriundas da colheita de trigo cultivado durante o período de abril a agosto de 2014.

No experimento de reinoculação, as sementes foram inoculadas com *A. brasilense* estirpes AbV5 e AbV6 na proporção de 2 mL do inoculante para 1000 sementes de trigo, tendo 10⁸ unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹) de inoculante. Da mesma forma, foi aplicado 2 mL de água para 1000

sementes no tratamento ausência de adubação + ausência de *A. brasilense* (T1). Os tratamentos das sementes foram realizados por meio de homogeneização em sacos de polietileno.

Após permanecerem em descanso durante 30 minutos foi realizada semeadura, onde as sementes foram depositadas em bandejas de polietileno com substrato areia autoclavada e acondicionadas em câmara de germinação a 20 ± 1 °C com fotoperíodo de 12:12. Foram distribuídas 25 sementes em cada unidade experimental. Diariamente as bandejas foram umedecidas com água.

Para quantificação das variáveis morfométricas foram selecionadas 10 plântulas normais. Os parâmetros mensurados foram: comprimento da parte aérea (CPA), diâmetro de coleto (DC) e comprimento do sistema radicular (CR) e sendo os resultados expressos em cm plântula⁻¹ para CPA, CH e CR e mm plântula⁻¹ para DC, além do número de raízes (NR) e volume de raízes (VR), expresso em cm⁻³.

Também foi determinado a massa da matéria seca da parte aérea (MSPA) e massa da matéria seca da raiz (MSR), avaliadas pela determinação da massa das mesmas dez plântulas utilizadas para CPA, CH, CR, DC e NR. O material vegetal foi secado em estufa de circulação fechada de ar para secagem à 65 ± 2 °C durante 72 horas até obterem massa constante, quando pesadas em balança analítica de precisão. Cada valor de massa da matéria seca de parte aérea e de raízes, foram obtidos pela divisão da massa total pelo número de plântulas, expressos em g plântula⁻¹; razão raiz/parte aérea (CR/CPA).

A análise estatística foi efetuada com o auxílio do programa Sisvar 5.1 Build 72 (Ferreira, 2011), de modo que os dados foram submetidos à análise de variância e, no caso de efeito significativo, utilizou-se o teste Tukey a 5% de probabilidade de erro para diferenciação das médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância determinou que houve interação entre adubação e reinoculação para as variáveis CR e NR (p<0,01) e CPA e VR (p<0,05) (Tabela 1). As demais variáveis não sofreram influências dos tratamentos testados (p>0,05).

Ao analisar o comportamento de CR e CPA, nota-se que as sementes que não receberam inoculação na geração F1, mas que em F2 receberam 120 kg ha⁻¹ de N com fertilizante (NET) + *A. brasilense* apresentaram desempenho superior comparada aos demais tratamentos para ambas as variáveis (Tabela 2).



Já ao avaliar as respostas de sementes de geração F2 que receberam inoculação em F1 para as mesmas variáveis, verifica-se que o tratamento 120 kg ha⁻¹ de N (ureia) + *A. brasilense* (T2) superou os demais tratamentos para CR e 120 kg ha⁻¹ de N com fertilizante (NET) + *A. brasilense* (T4) para CPA com a reinoculação comparado aos tratamentos ausência de adubação + ausência de *A. brasilense* (T1) e ausência de fertilizante + *A. brasilense* (T3) (**Tabela 2**).

Tabela 1. Resultado da análise de variância com valores de F: diâmetro de coleto (DC), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR), número de raízes (NR), volume de raízes (VR), massa seca de parte aérea (MSPA) e raiz (MSR), com ausência e presença de reinoculação com *A. brasilense* da cultivar CD 150, com diferentes adubações, Marechal Cândido Rondon, PR, 2014.

| Fonte de Variação | DC | CPA | CR | NR | VR | MSPA | MSR |
|-----------------------|-----------|--------------|-----------|-----------|----------------------|-------------|----------|
| | --mm-- | -----cm----- | | | --cm ³ -- | -----g----- | |
| Adubação | 4,040 * | 19,959 ** | 22,395 ** | 5,106 ** | 5,604 ** | 5,846 ** | 1,311 ns |
| Inoculação | 10,955 ** | 0,466 ns | 2,120 ns | 0,072 ns | 0,003 ns | 0,129 ns | 4,663 * |
| Adubação x Inoculação | 0,618 ns | 3,146 * | 17,815 ** | 13,020 ** | 3,238 * | 1,918 ns | 0,439 ns |
| C.V. (%) | 9,12 | 15,17 | 23,99 | 7,91 | 32,86 | 30,70 | 51,61 |
| DMS | 0,15 | 2,33 | 3,30 | 0,49 | 0,45 | 0,04 | 0,04 |

ns não significativo; ** significativo a 1%; * significativo a 5% pelo teste F; CV: coeficiente de variação; DMS: diferença mínima significativa.

Ao avaliar o comprimento de parte aérea não é possível notar diferença estatística entre os tratamentos de adubação, apenas, nas plantas provenientes de reinoculação houve diferença (**Tabela 2**).

Para número de raiz verifica-se que o tratamento ausência de adubação + ausência de *A. brasilense* (T1) com reinoculação apresentou o menor valor, diferindo estatisticamente (**Tabela 2**). Ainda nesta tabela, ao analisar o comportamento da reinoculação, nota-se que para a ausência de adubação + ausência de *A. brasilense* (T1) não inoculada obteve superioridade sobre as inoculadas. No entanto ao fornecer 120 kg ha⁻¹ de N com fertilizante (NET) + *A. brasilense* com reinoculação o comportamento é inverso, sendo os maiores valores obtidos para reinoculadas.

Quando analisado o volume de raiz, o tratamento 120 kg ha⁻¹ de N com fertilizante (NET) + *A. brasilense* (T4) não inoculado é superior ao ausência de fertilizante + *A. brasilense* (T3). Já quando ocorre a reinoculação os tratamento ausência de fertilizante + *A. brasilense* (T3) e 120 kg ha⁻¹ de N com fertilizante (NET) + *A. brasilense* (T4) são maiores que os demais (**Tabela 2**).

Tabela 2. Valores médios de ausência e presença de reinoculação com *A. brasilense* para as variáveis comprimento de raiz, comprimento de parte aérea, número de raiz, volume de raiz da cultivar CD 150, Marechal Cândido Rondon, PR, 2014.

| Adubação ⁽¹⁾ | Comprimento de raiz | | Comprimento de parte aérea | |
|-------------------------|---------------------|----------|----------------------------|-----------|
| | SI | CI | SI | CI |
| | -----mm----- | | -----cm----- | |
| T1 | 5,60 bA | 4,60 bA | 9,33 bA | 6,32 cB |
| T2 | 6,73 bB | 13,43 aA | 10,79 bA | 12,91 abA |
| T3 | 9,57 bA | 9,47 bA | 10,56 bA | 10,13 bA |
| T4 | 20,02 aA | 9,54 bB | 14,27 aA | 13,96 aA |
| D.M.S.Adu | 4,67 | | 3,29 | |
| D.M.S.Ino | 3,48 | | 2,46 | |

| Adubação ⁽¹⁾ | Número de raiz | | Volume de raiz | |
|-------------------------|----------------|---------|----------------|---------|
| | SI | CI | SI | CI |
| | | | -----mL----- | |
| T1 | 4,68 aA | 3,43 bB | 0,88 abA | 0,63 bA |
| T2 | 4,75 aA | 4,67 aA | 1,00 abA | 0,45 bA |
| T3 | 4,28 aA | 4,63 aA | 0,63 bA | 0,88 aA |
| T4 | 4,13 aB | 4,98 aA | 1,43 aA | 1,00 aA |
| D.M.S.Adu | 0,69 | | 0,64 | |
| D.M.S.Ino | 0,51 | | 0,48 | |

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si estatisticamente pelo Teste de Tukey (p < 0,05). T1 - ausência de adubação + ausência de *A. brasilense*, T2 - 120 kg ha⁻¹ de N (ureia) + *A. brasilense*, T3 - ausência de fertilizante + *A. brasilense* e T4 - 120 kg ha⁻¹ de N com fertilizante (NET) + *A. brasilense*. SI - Sem inoculação; CI - com inoculação. CV: Coeficiente de variação; DMS: Diferença mínima significativa.

Para diâmetro de coleto de modo geral, o tratamento T4 é maior que ausência de fertilizante + *A. brasilense* (T3), juntamente com o ausência de adubação + ausência de *A. brasilense* (T1) (**Figura 1 A**).

Se tratando de massa seca de parte aérea verifica-se que o fornecimento de adubação independente da fonte, proporcionou maiores valores comparado ao ausência de adubação + ausência de *A. brasilense* (T1) (**Figura 1 B**). Ao analisar a massa seca de raiz nota-se que a presença de inoculação acarretou em maiores massa seca de raiz (**Figura 1 C**). O sistema radicular se mostrou sensível a presença de *A. brasilense*, tais resultados corroboram com Taiz & Zeiger (2013). De acordo com Roesch (2005), a reinoculação em sementes de trigo aumenta no sistema radicular e incremento na fixação biológica de nitrogênio.

Resultados semelhantes são observados por Rampim et al., (2012) ao avaliar o comportamento de trigo em função da interação sementes inoculação bactérias diazotróficas e reguladores de crescimento. Uma hipótese para o aumento evidenciado é a possível ação hormonal proporcionada pelas bactérias, estimulando ou produzido hormônios vegetais (Baldani & Baldani, 2005).

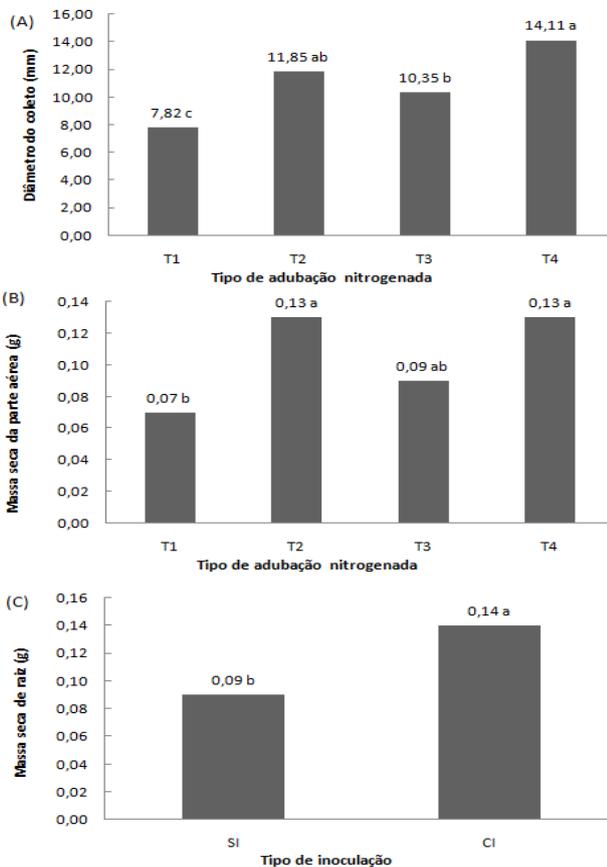


Figura 1. Atributos morfométricos e acúmulo de massa da cultivar CD 150, Marechal Cândido Rondon, PR, 2014. A- Diâmetro de coleto (mm) com diferentes adubações; B- Massa seca da parte aérea com diferentes adubações; C- Massa seca de raiz com e sem inoculação. T1 - ausência de adubação + ausência de *A. brasilense*, T2 - 120 kg ha⁻¹ de N (ureia) + *A. brasilense*, T3 - ausência de fertilizante + *A. brasilense* e T4 - 120 kg ha⁻¹ de N com fertilizante (NET) + *A. brasilense*. SI - Sem inoculação; CI - com inoculação.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a reinoculação se mostrou processo viável e adequado, não causando danos ao desenvolvimento da planta, e proporcionando aumento na qualidade das plântulas de trigo CD 150, principalmente ao sistema radicular.

AGRADECIMENTOS

À CAPES/PNPD, ao CNPq, ao INCT-FBN, à Secretaria de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Estado do Paraná, à Fundação Araucária e à Unioeste/PPGA.

REFERÊNCIAS

BALDANI, J. I. & BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. Anais da Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 77:549-579, 2005.

BODDEY, R. M. & DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. Fertilizer Research, Oxford, 42:241-250, 1995.

BODDEY, R. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. Plant and Soil, 95:109-121, 1986.

BRAGA, R. F. S. Avaliação da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de milho provenientes do cultivo associado a bactérias diazotróficas dos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum* reinoculadas com *Azospirillum*. 2012. 47p. Trabalho de Conclusão de Curso. (Curso de Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia, 35:1039-1042. 2011.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011, p. 17.

INIGUEZ, A. L.; DONG, Y. & TRIPLETT, E. W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumonia* 342. Molecular Plant-Microbe Interactions, 17:1078-1085, 2004.

RAMPIM, L.; PERES RODRIGUES-COSTA, A. C. P.; NACKE, H.; KLEIN, J.; GUIMARÃES, V. F. Qualidade fisiológica de sementes de três cultivares de trigo submetidos à inoculação e diferentes tratamentos. Revista Brasileira de Sementes, Londrina, 34:678 - 685, 2012.

ROESCH, L. F.; CAMARGO, F. O.; SELBACH, P. A. & SÁ, E. S. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. Ciência Rural, 35:1201-1204, 2005.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. Artmed, Porto Alegre, Brasil. 2013. 918p.