



Influência de bactérias diazotróficas na emergência e desenvolvimento inicial de sementes de *Anadenanthera colubrina*⁽¹⁾

Mayara Andria da Silva⁽²⁾; Emanuele Alessandra Tonin⁽²⁾; Luciana Alves Fogaça⁽³⁾; Valdemir Aleixo⁽³⁾; Vandeir Francisco Guimarães⁽⁴⁾; Jeferson Klein⁽³⁾

⁽¹⁾ Trabalho de conclusão de curso, Engenharia Ambiental, PUCPR, Câmpus de Toledo/PR.

⁽²⁾ Engenheira Ambiental, PUCPR, Câmpus Toledo/PR

⁽³⁾ Docente do curso de Engenharia Ambiental, Câmpus Toledo/PR – jeferson.klein@pucpr.br

⁽⁴⁾ Docente do curso de Agronomia Unioeste/ Câmpus de Marechal Cândido Rondon/PR

RESUMO: O avanço em pesquisas com bactérias diazotróficas que associam-se com espécies arbóreas do grupo das leguminosas poderão trazer grandes benefícios para reabilitação de áreas degradadas. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a influência da inoculação de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium japonicum* na emergência e desenvolvimento inicial das sementes de *Anadenanthera colubrina*. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, PUCPR, câmpus Toledo, abril e junho de 2014. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com quatro tratamentos e cinco repetições. O fator tratamento corresponde: T0 (ausência de bactérias diazotróficas); T1 (inoculação com *A. brasilense*); T2 (inoculação com a *B. japonicum*); e T3 (inoculação com associação em *A. brasilense* e *B. japonicum*). Estes tratamentos foram avaliados em duas épocas diferentes, 30 e 60 dias após a semeadura (DAS). Foram realizadas as seguintes análises: emergência; biométricas; bioquímicas e anatomia foliar. A microbiolização das sementes de angico branco com *B. japonicum* incrementou o índice de velocidade durante o período de 30 dias de avaliação, onde os melhores resultados foram observados para o comprimento do sistema radicular (CR), massa da matéria seca da parte aérea (CPA) e volume do sistema radicular (VR). Na avaliação de 60 dias os resultados não se apresentaram tão significativos, no entanto, foi possível observar que para o CPA a bactéria do gênero *Azospirillum* contribui de forma significativa para o desenvolvimento da espécie. Porém verifica-se a necessidade da continuação de estudos acerca da influência de bactérias diazotróficas.

Termos de indexação: Recuperação de área degradada; *Azospirillum brasilense*; *Bradyrhizobium japonicum*.

INTRODUÇÃO

O solo é um substrato primordial dos ecossistemas naturais, fundamental e essencial para a sobrevivência da humanidade (GONÇALVES, et al., 2008). Um dos problemas que levam a

degradação do solo é o desmatamento, deixando o solo exposto às condições do clima e tempo.

De acordo com Nogueira et al. (2012), dentre as medidas utilizadas no processo de recuperação de áreas degradadas, destaca-se à utilização de espécies florestais do grupo das leguminosas. Tal característica pode estar ligada ao potencial da interação com bactérias diazotróficas, que podem nodular e/ou contribuir na fixação biológica de nitrogênio, além de produzir ou estimular a produção de substâncias promotoras de crescimento (DOBEREINER, 1984). Dentre as nativas arbóreas da família Fabaceae (Leguminosae) florestais utilizadas para recuperação de áreas degradadas está a *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, popularmente conhecida como angico branco.

No entanto, estudos sobre interação entre bactérias diazotróficas e leguminosas arbóreas é recente, pois segundo Moreira e Siqueira (2006) a maioria dos trabalhos científicos publicados na literatura estão direcionados a espécies com interesse agrícola, tais, como: soja; feijão; milho; trigo, além de outros. Entre as diversas espécies de bactérias diazotróficas identificadas e avaliadas que estão sendo estudadas, destacam-se as do gênero *Azospirillum* (FERREIRA et al., 2007).

Apesar das propriedades fisiológicas já conhecidas sobre o gênero *Azospirillum* em meio de cultura já terem sido objeto de muitos estudos, ainda se conhece pouco sobre os mecanismos envolvidos na interação planta/bactéria, principalmente quanto à interação entre leguminosas arbóreas e bactéria (MARCHIORO, 2005). De acordo com o mesmo autor, outro gênero de bactéria é o *Bradyrhizobium*, que faz parte do grupo dos rizóbios, tendo a capacidade de formar simbiose. Estas bactérias são responsáveis por quase todo o nitrogênio assimilados pelas plantas de soja (BALDANI, J.; BALDANI, V., 2005).

Neste sentido, buscou-se avaliar a influência da inoculação de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium japonicum* na emergência e desenvolvimento inicial das sementes de *Anadenanthera colubrina*.



MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, localizada na Fazenda Experimental da PUCPR, câmpus Toledo/PR, entre os meses de abril e junho de 2014. A irrigação era realizada duas vezes ao dia, durante 16 minutos, totalizando 10 milímetros por período.

Características do solo e semente

O solo utilizado foi caracterizado conforme análises químicas e físicas realizadas na Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (COODETEC – Cascavel/PR), tendo as seguintes características: pH= 5,40; C= 20,02 g/dm³; P= 15,80 mg/dm³; Ca⁺= 5,61 cmol_c/dm³; Mg²⁺= 2,14 cmol_c/dm³; K⁺= 0,34 cmol_c/dm³; Al³⁺= 0,00 cmol_c/dm³; H+Al= 3,69 cmol_c/dm³; SB 8,09 cmol_c/dm³ e CTC 11,78 cmol_c/dm³; Cu= 5,91 mg/dm³; Zn= 9,61 mg/dm³; Fe= 47,09 mg/dm³; Mn= 113,48 mg/dm³; Argila= 710,0 g/k⁻¹; Silte= 17,0 g/k⁻¹; e Areias= 12,0 g/k⁻¹. O solo é classificado como Latossolo Vermelho Eutroférrico, característico da região (EMBRAPA, 1999).

Teste preliminar de germinação

As sementes utilizadas foram obtidas da espécie florestal *Anadenanthera colubrina* (angico branco), obtidas pela do banco de sementes da empresa Caiçara Comércio de Sementes Ltda, localizada em Brejo Alegre/SP. Cujo teste preliminar de germinação realizado na PUCPR apresentou 85% de sementes germinadas.

Para o teste de germinação foi utilizado caixas plásticas do tipo gerbox, constituídos de 4 repetições com 50 sementes cada. O experimento foi conduzido em câmara de germinação a 30°C (± 2°C) com fotoperíodo artificial de 12 horas, durante um período de 30 dias. O critérios adotado para o teste de germinação foi à emissão da radícula. O percentual de germinação e índice de velocidade de germinação foi determinado conforme BRASIL, (2009) e MAGUIRE, (1962).

Tratamentos e amostragens

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com quatro tratamento e cinco repetições. O fator tratamento corresponde: T0 (ausência de bactérias diazotróficas); T1 (inoculação com *Azospirillum brasilense*); T2 (inoculação com a *Bradyrhizobium japonicum*); e T3 (inoculação com associação em *A. brasilense* e *B. japonicum*). Estes tratamentos foram avaliados em duas épocas diferentes 30 e 60 dias após a semeadura (DAS). Para cada unidade amostral foram utilizadas 5 sementes por vaso.

A inoculação das bactérias diazotróficas nas sementes de angico branco foi realizada 12 horas

antes do momento da semeadura. A microbiolização foi realizada com 1,0 mL de inoculante (concentração de 1,9 x 10⁷ Unidades Formadoras de Colônia (UFC) mL⁻¹ para *A. brasilense*, e 1,8 x 10⁷ UFC para *B. japonicum*). Este volume de inoculante foi adicionado para 1000 sementes sob técnicas de assepsia.

Análises biométricas

Ao final dos 30 e 60 DAS, foram separadas as plântulas para avaliar as variáveis biométricas. Foram avaliados: o comprimento de raiz, em cm (CSR); comprimento de parte aérea, em cm (CPA) (utilizando como auxílio régua graduada). Também foi avaliado o diâmetro de coleto, em mm (DC), por meio de um paquímetro digital; volume de raiz, em mL (VSR), pelo método da proveta com volume inicial conhecido. As raízes e a parte aérea das mudas foram separadas e colocadas em sacos de papel e secas em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C por 72 horas, para quantificar a massa de matéria seca da raiz (MSR) e da parte aérea (MSPA), expressa em mg.

Análise estatísticas

Ao término das avaliações, os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o teste F (P ≤ 0,05). Posteriormente, as médias foram comparadas pelo teste de t (P ≤ 0,05). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa computacional SISVAR (FERREIRA, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao avaliar os resultados da análise de variância, foi possível verificar diferença significativa no comportamento das sementes de *A. colubrina* frente à ausência, presença ou combinação em relação às bactérias diazotróficas tanto durante o período de 30, quanto 60 dias após a semeadura (DAS) (tabela 1).

Tabela 1 - Análise de variância das variáveis: percentagem de emergência (EME), índice de velocidade de emergência (IVE), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento do sistema radicular (CSR), diâmetro do coleto (DC), volume do sistema radicular (VSR), massa da matéria seca da raiz (MSR) e massa da matéria seca da parte aérea (MSPA), de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (angico branco) inoculadas com bactérias diazotróficas do gênero *A. brasilense* e *B. japonicum* avaliadas durante 30 e 60 dias

Período (dias)	EME	IVE	CPA	CSR	DC	VSR	MSR	MSPA
30	2,460 ^{ns}	3,916*	1,823 ^{ns}	7,237*	1,599 ^{ns}	7,490**	0,261 ^{ns}	3,932*
CV (%)	26,59	25,37	14,78	20,79	10,65	43,62	63,54	37,15
DMS	1,82	1,88	1,87	4,8	0,03	0,20	0,03	0,05
60	-	-	3,767*	2,251 ^{ns}	1,425 ^{ns}	1,813 ^{ns}	2,602 ^{ns}	2,367 ^{ns}
CV (%)	-	-	10,35	10,61	14,91	71,08	63,83	65,44
DMS	-	-	1,68	3,41	0,04	0,22	0,08	0,21

^{ns} não significativa a 5% de probabilidade de erro, ** Significativo a 1% de probabilidade de erro e * Significativo 5% de probabilidade de erro.

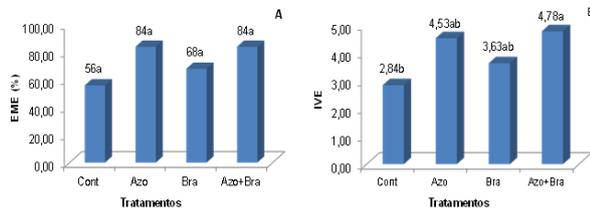
Em relação ao período de 30 DAS, os resultados apresentaram diferenças significativas apenas para as variáveis volume do sistema radicular (VSR), índice de velocidade de emergência



(IVE), o comprimento do sistema radicular (CSR) e massa de matéria seca da parte aérea (MSPA) (figura 1).

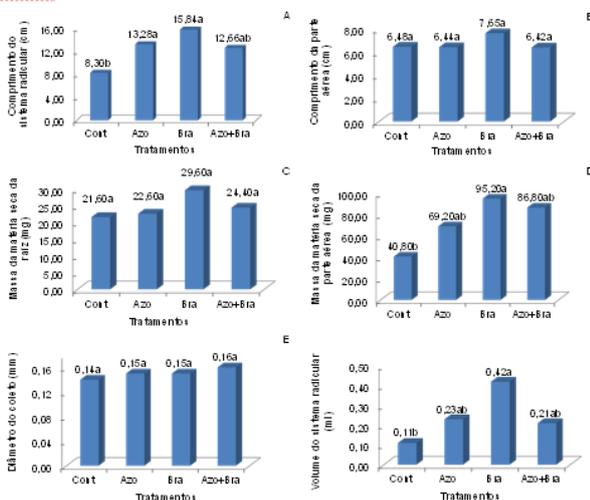
No período de 60 dias foi encontrado diferenças apenas para a variável CPA, quando as sementes de angico receberam inoculantes com associação entre *A. brasilense* e *B. japonicum* comparadas ao tratamento com inoculação de *B. japonicum*. Este resultado pode estar associado à capacidade que a espécie possui de se associar com as bactérias diazotróficas.

Figura 1 – Porcentagem de Emergência (EME (%)) e Índice de Velocidade de Emergência (IVE) de plântulas de angico branco (*A. colubrina*) avaliadas durante 30 DAS nos diferentes tratamentos controle (Cont), inoculação com *Azospirillum* (Azo), inoculação com *Bradyrhizobium* (Bra) e associação entre as duas bactérias (Azo+Bra).



Provavelmente, o efeito observado tenha sido motivado tanto por mecanismos hormonais estimulados pela bactéria, visto que a presença de *B. japonicum* na inoculação das sementes proporcionou incremento do sistema radicular de plântulas de angico branco, ou por meio da fixação biológica de nitrogênio (figura 2 A). Esta hipótese fica mais evidente ao analisar a ausência de nodulação em todos os tratamentos durante o período de 30 DAS. O que demonstra que a fixação biológica de nitrogênio (FBN), ou era nula, ou ocorria em tecidos ainda não nodulares.

Figura 2 – Variáveis avaliadas durante o período de 30 dias nos diferentes tratamentos, sendo (A) comprimento médio das raízes (cm); (B) comprimento médio da parte aérea (cm); (C) massa da matéria seca das raízes (mg); (D) massa da matéria seca da parte aérea (mg); (E) diâmetro do coleto (mm) e (F) volume médio das raízes (mL) nos diferentes tratamentos controle (Cont), inoculação com *Azospirillum* (Azo), inoculação com *Bradyrhizobium* (Bra) e associação entre as duas bactérias (Azo+Bra).

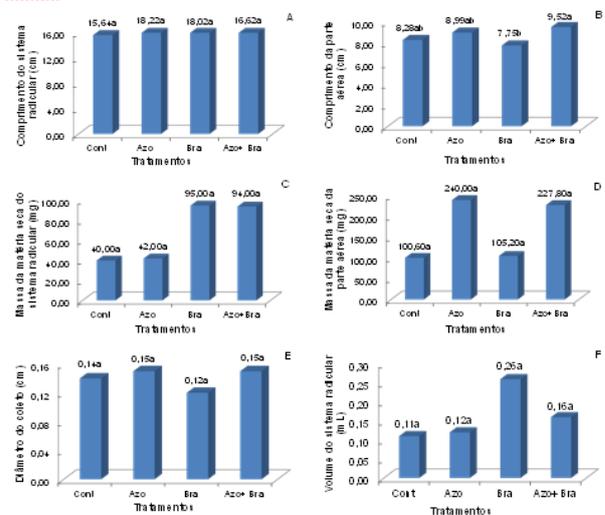


Assim, acredita-se que uma vez estimulado as células do tecido do sistema radicular via metabolismo hormonal, as plantas de angico branco encontraram meios para aproveitar melhor a absorção dos nutrientes do solo contribuindo, por exemplo, com os valores obtidos neste experimento para o volume de raiz (figura 2 F). Que por sua vez contribuiu para o incremento da massa da matéria seca da parte aérea (figura 2 D). Este resultado também foi identificado por Barbosa et al. (2013), onde o uso da inoculação com *B. japonicum*, promoveu o aumento da MSPA no cultivo de caupi.

As bactérias *B. japonicum* quando presentes junto à semeadura de angico branco nas condições testadas promoveram maiores incrementos para o comprimento do sistema radicular (CSR) e o volume do sistema radicular (VSR) (figura 2 A e F).

Avaliações realizadas durante o período de 60 DAS de modo geral apresentaram o mesmo comportamento com exceção da ausência da influência das combinações entre as bactérias testadas em algumas variáveis antes diferenciadas. Durante este período verificou-se que as sementes de angico branco quando receberam inoculantes *B. japonicum* permaneceram influenciando o comprimento e volume das raízes das plantas quando comparadas aquelas do tratamento controle (Figura 3 A e F). As demais variáveis não demonstraram sofrer interferências dos tratamentos aplicados.

Figura 7 – Variáveis avaliadas durante o período de 60 dias nos diferentes tratamentos, sendo (A) comprimento médio das raízes (cm); (B) comprimento médio da parte aérea (cm); (C) massa da matéria seca das raízes (mg); (D) massa da matéria seca da parte aérea (mg); (E) diâmetro do coleto (mm) e (F) volume médio das raízes (mL) nos diferentes tratamentos controle (Cont), inoculação com *Azospirillum* (Azo), inoculação com *Bradyrhizobium* (Bra) e associação entre as duas bactérias (Azo+Bra).



Aos 60 DAS (Figura 3), é possível verificar resultados significativos apenas para a variável CPA, onde o tratamento com associação das duas



bactérias diazotróficas (T3) foi superior ao tratamento com *B. japonicum*. Semelhantemente, o uso de *A. brasilense* em sementes de trigo, estimulou o CPA (RAMPIM et al., 2012), demonstrando a interferência positiva das bactérias diazotróficas no desenvolvimento inicial de plântulas quando comparados ao tratamento controle (ausência de bactérias).

CONCLUSÕES

A microbiolização das sementes de angico branco inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* incrementaram o índice de velocidade durante o período de 30 dias de avaliação, nas condições testadas. No período de 30 dias de avaliação as sementes de angico branco inoculadas com *B. japonicum* apresentaram melhores resultados para as variáveis: comprimento da parte aérea, massa seca da parte aérea e volume de raiz.

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*, 77: 549-579, 2005.
- BARBOSA, M. V.; NASCIMENTO, A. R. L. do; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S. & BEZERRA, R. V. Avaliação da inoculação do feijão caupi (*vigna unguiculata* (L.) walp consórciado com leguminosas arbóreas em sistema agroflorestal. In: III Congresso Nacional de Feijão Caupi. Recife, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 399p.
- DOBEREINER, J. Nodulação e fixação de nitrogênio em leguminosas arbóreas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 19: 83-90, 1984.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Sistema brasileiro de classificação de solos. Brasília, Embrapa Produção de Informações, Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 1999. 412p.
- FERREIRA, A. P.; CAMPELLO, E. F. C.; FRANCO, A. A. & RESENDE, A. S. de. Uso de leguminosas arbóreas fixadoras de nitrogênio na recuperação de áreas degradadas pela mineração de areia no polo produtor de Seropédica/ Itaguaí. Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia, 2007, 31p.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium*. Minas Gerais, 6: 36-41, 2008.
- GONÇALVES, J. L. de M.; NOGUEIRA Jr, L. R. & DUCATTI, F. Recuperação de solos degradados. In: KAGEYAMA, P. Y. et al. *Restauração Ecológica de Ecossistemas Naturais*. Butucatu: FEPAF, 2008. cap. 6. p. 11-164.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, Madison, 2: 176-177, 1962.
- MARCHIORO, L. E. T. Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio. *Revista Symposium*, Campinas, 6: 36-41, 2008.
- MOREIRA, F. M. de S & SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.
- NOGUEIRA, N. O.; OLIVEIRA, O. M.; MARTINS, C. A. S. & BERNARDES, C. O. Utilização de leguminosas para recuperação de áreas degradadas. *Enciclopédia Biosfera*, Goiânia, 8: 2121-2131, 2012.
- RAMPIM, L.; PERES RODRIGUES-COSTA, A. C. P.; NACKE, H.; KLEIN, J. & GUIMARÃES, V. F. Qualidade fisiológica de sementes de três cultivares de trigo submetidas à inoculação e diferentes tratamentos. *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina, 34: 678-685, 2012.