

DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE *Peltophorum dubium* E *Leucaena leucocephala* INOCULADAS COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

Leandro Rampim¹, Jeferson Klein², Claudio Yuji Tsutsumi³, Bruno Guilherme Marchiotti⁴,
Vandeir Francisco Guimarães³

¹Eng. Agrônomo, Dr., Unioeste, Marechal Cândido Rondon, PR, Brasil - rampimleandro@yahoo.com.br

²Biólogo, Dr., PUCPR, Toledo, PR, Brasil - jeferson.klein@pucpr.br

³Eng. Agrônomo, Dr., Unioeste, Marechal Cândido Rondon, PR, Brasil - cytsutsu@uol.com.br; vandeirfg@yahoo.com.br

⁴Eng. Agrônomo, Unioeste, Marechal Cândido Rondon, PR, Brasil - marchiotti@yahoo.com.br

Recebido para publicação: 24/05/2013 – Aceito para publicação: 06/04/2014

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de bactérias diazotróficas no desenvolvimento inicial de *Peltophorum dubium* e *Leucaena leucocephala* em casa de vegetação. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso em esquema fatorial 2 x 4 com quatro repetições, sendo que o primeiro fator foi formado pelas duas espécies florestais *P. dubium* e *L. leucocephala*, enquanto que o segundo fator está relacionado à microbiolização das sementes por estirpes das bactérias diazotróficas promotoras de crescimento *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium elkanii*, associação entre as duas bactérias e testemunha sem microbiolização. A microbiolização das sementes das espécies florestais com *A. brasilense*, *B. elkanii* e associação entre as bactérias *A. brasilense* e *B. elkanii* incrementaram a emergência de plântulas. Na canafístula, a *A. brasilense*, *B. elkanii*, isoladas ou em associação, elevaram a massa seca de parte aérea, comprimento de parte aérea e comprimento de sistema radicular, e reduziram diâmetro de coleto. Na leucena, a *B. elkanii* aumentou massa seca de raiz e reduziu diâmetro de coleto, e a *A. brasilense* incrementou massa seca de parte aérea e comprimento do sistema radicular, atingindo massa seca de parte aérea maior que a associação de *A. brasilense* e *B. elkanii*.

Palavras-chave: Canafístula; leucena; fixação biológica de nitrogênio; promoção de crescimento; rizobactérias.

Abstract

Initial development of plants of Peltophorum dubium and Leucaena leucocephala inoculated with diazotrophic bacteria. This research aimed to evaluate the influence of diazotrophic bacteria on initial development of *Peltophorum dubium* and *Leucaena leucocephala* in greenhouse. The experimental design was a randomized block in factorial 2 x 4 with four replications, with the first factor formed by the two forest species *P. dubium* and *L. leucocephala*, while the second factor was related to microbiolization seeds by strains of diazotrophic growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium elkanii*, association between the two bacteria and non-microbiolization control. The microbiolization seeds of forest species with *A. brasilense*, *B. elkanii* and association between the bacteria *A. brasilense* and *B. elkanii* improved seedling emergence of canafistula and leucaena. In canafistula, the *A. brasilense*, *B. elkanii* alone or in combination increased the dry weight of shoot, length of shoot and root length, and reduced diameter collect. In leucaena, *B. elkanii* increased the root dry weight and reduced diameter collect, and *A. brasilense* increased the dry weight of shoot and root system length, with higher dry shoot than association of *A. brasilense* and *B. elkanii*.

Keywords: Canafistula; leucena; biological nitrogen fixation; growth promotion; rhizobacteria.

INTRODUÇÃO

A recuperação de áreas degradadas pode ser feita utilizando-se tanto a canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng) Taub) quanto a leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.), por apresentarem

rápido crescimento (RODRIGUES; GANDOLFI, 2000), principalmente em encostas ou em cursos d'água (TUNDISI, 2010).

A canafístula é uma espécie arbórea, sendo utilizada na arborização urbana (NAKAGAWA *et al.*, 2010), com tolerância a baixas temperaturas, adaptando-se ao clima subtropical e temperado (PEREZ, 1999). Já a leucena é originada de solos férteis e bem drenados de regiões tropicais (COSTA; DURIGAN, 2010), tolerando altos níveis de temperatura e períodos de seca (BARCELLOS *et al.*, 2008). Além da produção de forragens e madeira, também pode ser usada no condicionamento do solo (BUDELMAN, 1988).

Porém a utilização tanto da canafístula quanto da leucena para a reposição florestal é prejudicada, visto que na produção de mudas podem apresentar restrições quanto à germinação e ao desenvolvimento inicial das plântulas, que são relacionadas às características tegumentares e dormência das sementes (SALERNO *et al.*, 1996; MATTEI, 1999; PEREZ *et al.*, 1999; TELES *et al.*, 2000; PEREZ *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2003; PAULINO *et al.*, 2004; VIECELLI *et al.*, 2011), reduzindo a eficiência na obtenção de mudas.

Para minimizar os efeitos da dormência dessas espécies, tem-se testado metodologias consolidadas para quebrar a dormência das sementes ou retirar os tecidos tegumentares que prejudicam a sua germinação. Perez *et al.* (2001) constataram que o condicionamento das sementes de *P. dubium* à temperatura amena de 10 °C permitiu embebição mais lenta, garantindo maior integridade das membranas celulares, com elevação no índice de germinação. Nessa espécie, Perez *et al.* (1999) e Viecelli *et al.* (2011) verificaram que as sementes podem ser escarificadas para quebra de dormência, elevando a porcentagem de germinação. Oliveira (2008) também evidenciou a necessidade de utilizar métodos para contornar a dormência proporcionada pelo tegumento nas sementes de *L. leucocephala*. Para Decker *et al.* (2011), o desenvolvimento inicial foi favorecido em baixa intensidade luminosa, demonstrando a possibilidade de usá-la como espécie secundária, mesmo sendo considerada pioneira.

Contudo, essas espécies fazem parte da família das leguminosas, as quais apresentam altos teores de proteína (POSSENTI *et al.*, 2008), sendo oportuno observar o comportamento das sementes quando inoculadas com bactérias diazotróficas. Essas bactérias apresentam a capacidade de reduzir o N₂ a NH₃ através da enzima nitrogenase, fixando nitrogênio atmosférico (BERGAMASCHI, 2006; HUNGRIA, 2011; KLEIN *et al.*, 2012), assim como atuação como promotoras de crescimento vegetal (CATTELAN, 1999; SALA *et al.*, 2005; BALDANI; BALDANI, 2005; HUNGRIA, 2011; RAMPIM *et al.*, 2012; DARTORA *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2014), tanto estimulando quanto produzindo fitoreguladores (BALDANI; BALDANI, 2005; REIS; TEIXEIRA, 2005). Para Döbereiner (1966), Abbas (2001) e Kuss *et al.* (2007), as bactérias diazotróficas podem atuar em outras espécies da família das leguminosas, ocorrendo promoção de crescimento vegetal.

A correta utilização desses micro-organismos no setor florestal ainda é uma incógnita, dependendo do conhecimento de sua diversidade, mecanismos de interação bactéria-planta e da habilidade de manejo de populações benéficas, para serem utilizadas com a finalidade de elevar a efetividade durante a produção de mudas e no desenvolvimento das plantas na recuperação de áreas degradadas. A densidade populacional desses micro-organismos também pode variar, dependendo de sua interação com o genótipo da planta ou com os fatores ambientais (CARDOSO *et al.*, 2010), representando uma parcela da biota do solo funcionalmente ativa, além de estarem presentes na rizosfera e no interior das plantas hospedeiras (KUSS *et al.*, 2007).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a efetividade de estirpes das bactérias diazotróficas *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium elkanii* na promoção do desenvolvimento inicial de canafístula (*Peltophorum dubium*) e leucena (*Leucaena leucocephala*) em casa de vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido em casa de vegetação, na Estação de Horticultura e Cultivo Protegido “Prof. Dr. Mário César Lopes”, pertencente ao Núcleo de Estações Experimentais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste, *Campus* de Marechal Cândido Rondon, PR, no mês de outubro de 2011.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso em esquema fatorial 2 x 4, totalizando oito tratamentos com quatro repetições, perfazendo 32 parcelas experimentais. O primeiro fator foi formado

pelas espécies *Peltophorum dubium* (canafístula) e *Leucaena leucocephala* (leucena), e o segundo fator consistiu na microbiolização das sementes com as estirpes de *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium elkanii* e associação entre as duas espécies bacterianas, tendo como testemunha sementes não microbiolizadas. As estirpes de *A. brasilense* AbV5 e AbV6 foram cedidas pelo Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (UFPR), *Campus* de Curitiba, PR, Brasil. Já as estirpes de *B. elkanii*, SEMIA 5019 e SEMIA 587, foram adquiridas do Simbiose Nod[®]. Independentemente da estirpe utilizada, as formulações apresentavam-se em estado aquoso com densidade de 1,00 g.cm⁻³. Esses compostos possuíam concentrações específicas de cada patrocinador dos seguintes componentes: água (solvente/suporte), extrato de levedura (cloreto de amônio – fonte de nitrogênios e vitaminas), glicerol e ácido málico (fonte de carbono), fosfato de potássio, sulfato de magnésio, cloreto de sódio, cloreto de cálcio, EDTA férrico, sulfato de cobre, sulfato de zinco, ácido bórico, molibdato de sódio e sulfato de manganês (fontes de nitrogênio).

Inicialmente, frutos maduros de canafístula e leucena foram coletados em diversas matrizes no mês de setembro de 2011, no Horto Florestal no *Campus* da Unioeste em Marechal Cândido Rondon, PR. Após a coleta, os frutos foram levados ao Laboratório de Fisiologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias, onde foram abertos para a remoção das sementes, excluindo-se aquelas que aparentemente encontravam-se danificadas, bem como as de tamanho reduzido ou malformadas. Em seguida, as sementes foram submetidas à superação de dormência através de escarificação mecânica manual com lixa nº P 80. Posteriormente, foram imersas e mantidas em água à temperatura ambiente, por 12 horas, sendo selecionadas para a sementeira apenas aquelas que apresentavam dormência superada, identificada por sinais de embebição.

Em seguida, as bactérias foram dispensadas por microbiolização, 0,2 mL de inoculante (na concentração de 2×10^8 UFC mL⁻¹) para 200 sementes sob técnicas de assepsia em câmara de fluxo e acondicionada em pacotes plásticos.

Após a microbiolização, procedeu-se à sementeira em substrato de areia, previamente autoclavado a 105 °C, 1,5 atm por 30 minutos, em uma profundidade de 2,0 cm, com 100 sementes para canafístula e 100 sementes para leucena.

Posteriormente foram realizadas as avaliações, conforme a regra de análise de sementes (BRASIL, 2010). Para obter o índice de velocidade de emergência (IVE), foi realizado o seguinte procedimento: a partir do início da emergência das plântulas, fez-se contagem diária do número de plântulas emergidas até 30 dias após a sementeira (30 DAS) (MAGUIRE, 1962). Para a determinação da porcentagem de emergência (EME), foi considerada a última contagem das plântulas, realizada aos 30 DAS. Após, separaram-se 10 plântulas, para serem avaliadas as variáveis biométricas relativas ao desenvolvimento inicial das plântulas: comprimento de raiz (CSR) (em cm) e comprimento de parte aérea (CPA) (em cm), realizadas com o auxílio de uma régua graduada (em cm). Também foi avaliado o diâmetro de coleto (DC) (em mm), através de um paquímetro digital, e, ainda, o volume de raiz (VSR) (em mL), 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 secadas em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C por 72 horas, para quantificar a massa de matéria seca da raiz (MSR) e a massa de matéria seca da parte aérea (MSPA) (em mg).

Ao término das avaliações, os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o teste F ($p \leq 0,05$), com o auxílio do programa computacional SISVAR (FERREIRA, 2008), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A relação entre as espécies vegetais e as estirpes bacterianas apresentaram interação significativa para as variáveis estudadas (Tabela 1 e 2). O comportamento da microbiolização com *A. brasilense*, *B. elkanii* e associação entre as duas bactérias para as variáveis porcentagem de emergência, índice de velocidade de emergência, comprimento da parte aérea, diâmetro de coleto das plântulas, comprimento do sistema radicular, volume do sistema radicular, massa seca da raiz e massa seca da parte aérea variaram em relação às plântulas de canafístula (*Peltophorum dubium*) e leucena (*Leucaena leucocephala*) (Tabela 1).

A porcentagem de emergência e o índice de velocidade de emergência para a espécie leucena foram superiores aos valores da canafístula, com EME e IVE de 86,00% e 5,84, e 22,25% e 1,41,

respectivamente, para as espécies florestais no tratamento sem inoculante. Essa superioridade da leucena se manteve para os demais tratamentos (Tabela 2). Houve incremento do EME para a leucena com a microbiolização com as estirpes de *A. brasilense* e *B. elkanii* em relação à testemunha, assim como IVE superior aos demais tratamentos com a utilização da estirpe de *B. elkanii*. É necessário destacar que na literatura problemas de germinação para a leucena são caracterizados por Teles *et al.* (2000), Paulino *et al.* (2004) e Oliveira (2008), fato não constatado neste trabalho após a escarificação, mesmo na ausência dos tratamentos com as bactérias diazotróficas, evidenciando o efeito da escarificação no processo de germinação para a leucena.

Tabela 1. Análise de variância das variáveis percentagem de emergência (EME), índice de velocidade de emergência (IVE), comprimento da parte aérea (CPA), diâmetro de coleto das plântulas (DC), comprimento do sistema radicular (CSR), volume do sistema radicular (VSR), massa seca da raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA) de plântulas de canafístula (*Peltophorum dubium*) e leucena (*Leucaena leucocephala*) e microbiolizadas com *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium elkanii* cultivadas em areia e avaliadas aos 30 DAS.

Table 1. Analysis of variance of Percentage Emergence Variables (EME), Emergence Rate Index (IVE), Shoot Length (CPA), Collect Seedling Diameter (DC), Length of the Root System (CSR), Root System Volume (VSR), Root Dry Mass (MSR), Shoot Dry Mass (MSPA), for seedling of canafístula (*Peltophorum dubium*) and leucaena (*Leucaena leucocephala*), microbiolized with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium elkanii* grown in sand and assessed 30 DAS.

FV	EME	IVE	CPA	DC	CSR	VSR	MSR	MSPA
Espécie vegetal (E)	23382,03**	123,63**	0,29 ^{ns}	0,048**	89,31**	0,0010**	4,21**	3,21**
Espécie bacteriana (B)	606,11**	2,15**	0,71**	0,024**	2,52*	0,0001 ^{ns}	0,14**	0,04**
E x B	134,86**	0,36**	0,72**	0,028**	7,13**	0,0002*	0,08**	0,10**
CV	3,99	3,93	6,11	3,86	7,86	28,33	6,17	17,00

^{ns} não significativo; ** significativo a 1%; * significativo a 5%, pelo teste F.

Tabela 2. Valores médios da percentagem de emergência (EME) e índice de velocidade de emergência (IVE) de plântulas de canafístula (*P. dubium*) e leucena (*L. leucocephala*) e microbiolizadas com *A. brasilense* e *B. elkanii* cultivadas em areia e avaliadas aos 30 DAS.

Table 2. Mean values of percentage emergence (EME) and emergence rate index (IVE) seedling of canafístula (*P. dubium*) and leucaena (*L. leucocephala*) and microbiolized with *A. brasilense* and *B. elkanii* grown in sand and assessed 30 DAS.

	EME (%)		IVE	
	Canafístula	Leucena	Canafístula	Leucena
Sem microbiolização	22,25 Bd	86,00 Ac	1,41 Bc	5,84 Ab
<i>Azospirillum</i>	30,75 Bc	88,75 Ab	1,86 Bb	6,00 Ab
<i>Bradyrhizobium</i>	51,00 Ba	98,00 Aa	3,02 Ba	6,63 Aa
<i>Azospirillum</i> x <i>Bradyrhizobium</i>	36,25 Bb	83,75 Ad	2,16 Bb	5,70 Ab
DMS _{Espécie}	3,65		0,24	
DMS _{Bactéria}	4,89		0,32	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas entre espécies e letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

A reduzida emergência evidenciada para sementes de canafístula, observada principalmente na testemunha na tabela 2, demonstra problemas de germinação da espécie, provavelmente devido às características abióticas ligadas durante o período de formação das sementes, aumentando a dormência das sementes mesmo com a escarificação mecânica (SALERNO *et al.*, 1996; PEREZ *et al.*, 1999; PEREZ *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2003; VIECELLI *et al.*, 2011). No entanto, a presença das bactérias, independentemente do tratamento, promoveu maiores taxas de EME, principalmente na associação entre as estirpes de *A. brasilense* e *B. elkanii*.

Para a canafístula, Salerno *et al.* (1996) comentaram que a presença de tegumento nas sementes impede a penetração da água e o desencadeamento dos processos metabólicos próprios da germinação.

Para Matteio (1999), os problemas de germinação da semente de canafístula não são causados por problemas fisiológicos, mas por uma camada paliçada no tegumento. Entretanto, neste estudo, a microbiolização com *A. brasilense* e *B. elkanii* ou a associação das duas estirpes bacterianas incrementou o EME e IVE da canafístula, com destaque para o tratamento com *B. elkanii*, que proporcionou maior EME e IVE, provavelmente devido aos efeitos de promoção de crescimento vegetal proporcionado pelas bactérias diazotróficas (CATTELAN, 1999; REIS; TEIXEIRA, 2005; SALA *et al.*, 2005; BALDANI; BALDANI, 2005; HUNGRIA, 2011; KLEIN *et al.*, 2012; RAMPIM *et al.*, 2012; DARTORA *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2014).

Contudo, são raros os relatos quanto às baixas taxas de emergência das mesmas espécies quando são submetidas à escarificação, identificado na testemunha. Viecelli *et al.* (2011) identificaram incremento de germinação de sementes de canafístula sem escarificação e tratadas com água de coco rica em citocinina, constatando 0% e 17% de germinação e 1% e 72% de embebição para a testemunha e água de coco, respectivamente.

Sendo assim, evidencia-se a necessidade de determinação de variáveis metabólicas presentes nas sementes, principalmente relacionadas com hormônios vegetais. Uma hipótese para o aumento evidenciado na germinação de canafístula é a possível ação hormonal proporcionada pelas bactérias, estimulando ou produzido hormônios vegetais (BALDANI; BALDANI, 2005; HUNGRIA, 2011).

Nas variáveis massa seca da raiz, massa seca da parte aérea e volume do sistema radicular e comprimento do sistema radicular, em todos os tratamentos, assim como no comprimento da parte aérea para o tratamento-testemunha, observa-se o comportamento superior das plântulas de leucena em relação às de canafístula, provavelmente devido às alterações fisiológicas mais atuantes na canafístula (Tabela 3, 4 e 5). Apenas no diâmetro de coleto o comportamento das plântulas de canafístula se assemelharam estatisticamente às de leucena (Tabela 5).

Tabela 3. Valores médios de massa seca de raiz (MSR) e massa seca de parte aérea (MSPA) de plântulas de canafístula (*P. dubium*) e leucena (*L. leucocephala*) e microbiolizadas com *A. brasilense* e *B. elkanii* cultivadas em areia e avaliadas aos 30 DAS.

Table 3. Average values of root dry mass (MSR) and dry mass (MSPA), for seedling of canafístula (*P. dubium*) and leucena (*L. leucocephala*), microbiolized with *A. brasilense* and *B. elkanii*, grown in sand and assessed 30 DAS.

	MSR (mg)		MSPA (mg)	
	Canafístula	Leucena	Canafístula	Leucena
Sem microbiolização	0,03 Ba	0,52 Ac	0,07 Bb	1,14 Aab
<i>Azospirillum</i>	0,06 Ba	0,94 Aab	0,23 Bab	1,31 Aa
<i>Bradyrhizobium</i>	0,12 Ba	1,03 Aa	0,36 Ba	1,12 Aab
<i>Azospirillum</i> x <i>Bradyrhizobium</i>	0,10 Ba	0,72 Abc	0,41 Ba	1,03 Ab
DMS _{Espécie}	0,21		0,18	
DMS _{Bactéria}	0,28		0,24	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas entre espécies e letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 4. Valores médios do comprimento da parte aérea (CPA) e diâmetro do coleto da plântula (DC) de plântulas de canafístula (*P. dubium*) e leucena (*L. leucocephala*) microbiolizadas com *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium elkanii* cultivadas em areia e avaliadas aos 30 DAS.

Table 4. Average values of root dry mass (MSR) and dry mass (MSPA), for seedling of canafístula (*P. dubium*) and leucena (*L. leucocephala*), microbiolized with *A. brasilense* and *B. elkanii*, grown in sand and assessed 30 DAS.

	CPA (cm)		DC (mm)	
	Canafístula	Leucena	Canafístula	Leucena
Sem microbiolização	5,07 Bb	6,09 Aa	1,22 Aa	1,28 Aa
<i>Azospirillum</i>	5,96 Aa	6,18 Aa	1,12 Bb	1,25 Aa
<i>Bradyrhizobium</i>	6,42 Aa	6,16 Aa	1,12 Ab	1,14 Ab
<i>Azospirillum</i> x <i>Bradyrhizobium</i>	6,09 Aa	5,86 Aa	1,10 Ab	1,19 Aab
DMS _{Espécie}	0,54		0,07	
DMS _{Bactéria}	0,72		0,09	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas entre espécies e letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 5. Valores médios do comprimento do sistema radicular (CSR) e volume do sistema radicular (VSR) de plântulas de canafístula (*P. dubium*) e leucena (*L. leucocephala*) microbiolizadas com *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium elkanii* cultivadas em areia e avaliadas aos 30 DAS.

Table 5. Average values for the length of the radicle system (CSR) and root system volume (VSR), for seedling of canafístula (*P. dubium*) and leucena (*L. leucocephala*), microbiolized with *A. brasilense* and *B. elkanii*, grown in sand and assessed 30 DAS.

	CSR (cm)		VSR (mL)	
	Canafístula	Leucena	Canafístula	Leucena
Sem microbiolização	6,31Bb	11,05 Ab	0,017 Ba	0,033 Aab
<i>Azospirillum</i>	7,47 Bab	12,54 Ab	0,020 Ba	0,035 Aab
<i>Bradyrhizobium</i>	8,55 Ba	9,68 Ab	0,028 Ba	0,023 Ab
<i>Azospirillum</i> x <i>Bradyrhizobium</i>	8,24 Ba	10,66 Ab	0,023 Ba	0,043 Aa
DMS _{Espécie}		1,08		0,011
DMS _{Bactéria}		1,44		0,015

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas entre espécies e letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

A MSR para a canafístula apresentou comportamento semelhante para todos os tratamentos testados, contudo houve valor superior da MSR com a microbiolização das sementes com *A. brasilense* e *B. elkanii* em relação à testemunha para a espécie leucena (Tabela 3). Já na MSPA, foi observado valor superior ao da testemunha com a estirpe de *B. elkanii* e a associação entre as estirpes de *A. brasilense* e *B. elkanii* para a espécie canafístula. Para a leucena, a estirpe *A. brasilense* proporcionou MSPA superior ao da associação das bactérias, no entanto ambos os tratamentos apresentaram MSPA semelhante à da testemunha.

O resultado de a microbiolização com as bactérias diazotróficas ter favorecido a EME e o IVE (Tabela 2), assim como MSPA e MSR (Tabela 3) de canafístula e leucena, também foi identificado por Sala *et al.* (2008) em trigo, especificamente com o tratamento das sementes com uma estirpe de *A. brasilense*. No presente estudo, a estirpe de *A. brasilense* proporcionou valores superiores aos da testemunha, para MSR e para MSPA para plântulas de leucena e canafístula, respectivamente. Esses resultados são relevantes, por diminuírem os efeitos dos problemas de germinação da canafístula (SALERNO *et al.*, 1996; MATTEI, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2003; VIECELLI *et al.*, 2011) e leucena (TELES *et al.*, 2000; PAULINO *et al.*, 2004; OLIVEIRA, 2008), demonstrando a necessidade de mais trabalhos envolvendo estirpes de *A. brasilense* e *B. elkanii* e sua interação com canafístula e leucena, como, por exemplo, a utilização de concentrações diferenciadas de propágulos na suspensão bacteriana.

Com relação à variável comprimento de parte aérea, a espécie leucena apresentou valor superior ao da canafístula no tratamento-testemunha (Tabela 4). Em relação à leucena, não se verificou diferença significativa entre os tratamentos com microbiolização das sementes com bactérias diazotróficas, todavia, para canafístula houve incremento do CPA com as estirpes de *A. brasilense* e *B. elkanii* e na associação entre elas (Tabela 4). Da mesma forma, para a variável comprimento do sistema radicular (CSR), houve incremento para a canafístula com a inoculação das estirpes de *A. brasilense* e *B. elkanii* e na associação das rizobactérias, e para a leucena apenas com a *A. brasilense* (Tabela 5). De forma análoga, em culturas anuais, Rampim *et al.* (2012) detectaram incremento de comprimento de parte aérea e de raiz com tratamento de sementes de trigo com *A. brasilense*, demonstrando a interferência positiva das bactérias diazotróficas no desenvolvimento inicial de plântulas.

Para Okon e Labandera-Gonzalez (1994) e Santos e Vieira (2005), *A. brasilense* produz substâncias promotoras de crescimento. Baldani *et al.* (2009) e Hungria *et al.* (2011) atribuem a *A. brasilense* os efeitos fisiológicos decorrentes dessas substâncias, identificados através dos efeitos na MSPA, CPA e CSR, tanto para a espécie florestal canafístula quanto para a leucena. Não obstante, o incremento do comprimento de raiz (Tabela 5) observado com os tratamentos com as bactérias pode repercutir em ampliação da área de solo para a absorção de água (CORREIA; NOGUEIRA, 2004), principalmente após a implantação das mudas em campo.

Para a variável volume do sistema radicular, ao ocorrer interferência significativa entre a microbiolização das sementes com as bactérias *A. brasilense* e *B. elkanii* (Tabela 5), constatou-se valor superior de VSR para leucena em relação à canafístula. Para a espécie canafístula, foi possível observar valores de VSR semelhantes entre os tratamentos avaliados. Na leucena, o tratamento *B. elkanii* foi

superior à associação de *A. brasilense* com *B. elkanii*, entretanto ambos os tratamentos foram semelhantes à testemunha.

Por outro lado, o diâmetro de coleto da canafístula e leucena foi reduzido com a utilização das bactérias diazotróficas, apenas havendo menor DC para a canafístula em relação à leucena no tratamento com a estirpe de *A. brasilense* (Tabela 5). Semelhantemente, o uso de uma estirpe de *A. brasilense* em sementes de trigo reduziu o diâmetro de colo, contudo estimulou CPA e CSR (RAMPIM *et al.*, 2012). Na canafístula foi identificada redução do DC para os tratamentos com as bactérias *A. brasilense*, *B. elkanii* e na associação, com valores superiores aos da testemunha, fato provavelmente relacionado à elevação do CPA proporcionada pelas bactérias diazotróficas (Tabela 4).

Para a leucena, constatou-se valor inferior de DC em relação à testemunha apenas para o tratamento com a estirpe de *B. elkanii*. Por outro lado, as bactérias diazotróficas podem ter comportamento diferenciado entre espécies, visto que, em sementes de milho, a associação de *A. brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* proporcionou maior diâmetro basal do colmo de milho na fase vegetativa em relação à testemunha, com aumento de 15% (DARTORA *et al.*, 2013).

De fato, tem-se diversas metodologias já testadas para superar a dormência tegumentar e auxiliar os viveiristas na formação de mudas de canafístula e leucena, como a escarificação mecânica e química, além da imersão de sementes em água quente (TELES *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2003; PAULINO *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2008) e imersão em água de coco (VIECELLI *et al.*, 2011), com o intuito de elevar o índice de germinação. Nesse contexto, a utilização de bactérias diazotróficas associada aos métodos de escarificação se destaca ao incrementar o desenvolvimento inicial das espécies florestais estudadas, especialmente para a canafístula, pois o processo de microbiolização das sementes das espécies florestais é fácil, ágil e com baixo custo, aumentando a eficiência dos viveiristas na produção de mudas.

De forma geral, a utilização das bactérias diazotróficas incrementaram o desenvolvimento de CPA (Tabela 4), CSR (Tabela 5) e MSPA (Tabela 3), juntamente com aumento da EME e IVE na canafístula (Tabela 2). Isso minimizou o problema inicial de germinação e desenvolvimento das plântulas, sobretudo a redução do DC (Tabela 4) com a atuação das bactérias, que podem deixar as plântulas mais vulneráveis se implantadas diretamente à campo. Nesse sentido, a etapa de rustificação durante a produção de mudas oriundas de microbiolização de sementes de canafístula permite adequar as plantas para serem instaladas em sistemas de recuperação de áreas degradadas.

CONCLUSÕES

- A microbiolização das sementes de canafístula e leucena com as estirpes de *A. brasilense* e *B. elkanii* e associação entre essas estirpes incrementaram a emergência de plântulas.
- Para canafístula, a microbiolização com a estirpe de *A. brasilense* ou *B. elkanii* isoladas ou em associação elevou a massa seca de parte aérea, o comprimento de parte aérea e o comprimento do sistema radicular, e reduziram o diâmetro de coleto.
- Para leucena, a microbiolização das sementes com a estirpe de *B. elkanii* aumentou a massa seca de raiz e reduziu o diâmetro de coleto, e a estirpe de *A. brasilense* incrementou a massa seca de parte aérea e o comprimento do sistema radicular, atingindo massa seca de parte aérea maior que a associação das duas estirpes bacterianas.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná, afiliada à Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI), à CAPES/PNPD e ao CNPq/INCT-FBN, pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

ABBAS, M. Intercropping of sesbania (*Sesbania sesban*) and leucaena (*Leucaena leucocephala*) with five annual grasses under semi-arid conditions as affected by inoculation with specific rhizobia and associative diazotrophs. *Agronomie*, v. 21, n. 6 - 7, p. 517 - 525, 2001.

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, v. 77, n. 3, p. 549 - 579, 2005.

BALDANI, J. I.; TEIXEIRA, K. R. S.; SCHWAB, S.; OLIVEIRA, F. L.; HEMERLY, A. S.; URQUIAGA, S. E. T. Fixação biológica de nitrogênio em plantas da família Poaceae (antiga gramineae). In: RIBEIRO, M. R.; NASCIMENTO, C. W. A.; RIBEIRO FILHO, M. R.; CANTALICE, J. R. B. (Orgs.). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. p. 203 - 272.

BARCELLOS, A. de O.; RAMOS, A. K. B.; VILELA, L.; MARTHA JUNIOR, G. B. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. especial, p. 51 - 67, 2008.

BERGAMASCHI, C. **Bactérias diazotróficas associadas a raízes e colmos de cultivares de sorgo**. 2006. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/7477>>. Acesso em: 05/07/2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2010. 395 p.

BUDELMAN, A. The performance of the leaf mulches of *Leucaena leucocephala*, *Flemingia macrophylla* and *Gliricidia sepium* in weed control. **Agroforestry Systems**, v. 6, p. 137 - 145, 1988.

CARDOSO, I. C. M.; KLAUBERG FILHO, O.; MARIOTTO, J. R.; MIQUELLUTI, D. J.; VICENTE, D.; NEVES, A. N. Ocorrência de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* em arroz irrigado no estado de Santa Catarina. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 9, n. 2, p. 178 - 186, 2010.

CATTELAN, A. J.; HARTEL, P. G.; FUHRMANN, J. J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. **Soil Science Society of America**, v. 63, p. 1670 - 1680, 1999.

CORREIA, K. G.; NOGUEIRA, R. J. M. C. Avaliação do crescimento do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) submetido a déficit hídrico. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, Campina Grande, v. 4, n. 2, p. 102 - 109, 2004.

COSTA, J. N. M. N. da; DURIGAN, G. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Fabaceae): invasora ou ruderal? **Revista Árvore**, Viçosa, v. 34, n. 5, p. 825 - 833, 2010.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 10, p. 1023 - 1029, 2013.

DECKER, V.; KLOSOWSKI, É. S.; CONTRO MALAVASI, U.; NUNES, A. Avaliação da intensidade luminosa no desenvolvimento inicial de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 4, p. 609 - 618, 2011.

DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp. n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de Paspalum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 1, p. 357 - 365. 1966.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Campinas, v. 6, p. 36 - 41, 2008.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa, 2011. 36 p. (Embrapa. Boletim Técnico, 325).

KLEIN, J.; RAMPIM, L.; NACKE, H.; RODRIGUES-COSTA, A. C. P.; GUIMARÃES, V. F. Qualidade nutricional de plântulas de cultivares de trigo submetidas a inoculação com *Azospirillum*, bioestimulante e triadimenol. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 11, n. (suplemento), p. 59 - 69, 2012.

- KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLORES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 10, p. 1459 - 1465, 2007.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176 - 177, 1962.
- MATTEI, V. L. Efeito de tratamento em sementes dormentes de *Acacia trinervis* (*Acacia longifolia* Willd), sobre a germinação em laboratório, emergência e desenvolvimento inicial em viveiro. **Revista Brasileira de Agrociências**, Pelotas, v. 5, n. 3, p. 185 - 189, 1999.
- NAKAGAWA, J.; MORI, E. S.; PINTO, C. da S.; FERNANDES, K. H. P.; SEKI, M. S.; MENEGHETTI, R. A. Maturação e secagem de sementes de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert (canafístula). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 34, n. 1, p. 49 - 56, 2010.
- OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, p. 1591 - 1601, 1994.
- OLIVEIRA, A. B. Germinação de sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit.), var. K-72. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 8, n. 2, p. 166 - 172, 2008.
- OLIVEIRA, L. M.; DAVIDE, A. C.; CARVALHO, M. L. M. Avaliação de métodos para quebra da dormência e para a desinfestação de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.)Taubert). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 5, p. 597 - 603, 2003.
- PAULINO, V. T.; FREITAS, J. C. T.; JÚNIOR, C. R.; DALLE VEDOVE, D. J. F.; SOUZA, C. F. J.; NATAL, V. Escarificação de sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) cultivares Cunnighan e Piracicaba. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Garça, n. 6, 2004.
- PEREZ, S. C. J. A.; WANLI, Z.; LEIHONG, L. Pré-condicionamento e seus efeitos em sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng) Taub). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 146 - 153, 2001.
- PEREZ, S. C. J. G. de A.; FANTI, S. C.; CASALI, C. A. Dormancy break and light quality effects on seed germination of *Peltophorum dubium* (Spreng) Taubert - canafístula. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 5, n. 2, p. 131 - 137, 1999.
- POSSENTI, R. A.; SCHAMMAS, R. F. E. A.; DEMARCHI, J. J. de A.; FRIGHETTO, R. T. S. Efeitos de dietas contendo *Leucaena leucocephala* e *Saccharomyces cerevisiae* sobre a fermentação ruminal e a emissão de gás metano em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 8, p. 1509 - 1516, 2008.
- 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, v. 34, n. 4, p. 678 - 685, 2012.
- REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S. Fixação biológica de nitrogênio - estado da arte. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. **Processos biológicos no sistema solo-planta**: ferramentas para uma agricultura sustentável. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 151 - 180.
- RODRIGUES, L. F. O. S.; GUIMARÃES, V. F.; SILVA, M. B.; PINTO JÚNIOR, A. S.; KLEIN, J.; COSTA, A. C. P. R. da. Características agrônômicas do trigo em função de *Azospirillum brasilense*, ácidos húmicos e nitrogênio em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 1, p. 31 - 37, 2014.
- RODRIGUES, R. R.; GANDOLFI, S. Conceitos, tendências e ações para a recuperação de florestas ciliares. In: RODRIGUES, R. R.; LEITÃO FILHO, H. F. **Matas ciliares**: conservação e recuperação. São Paulo: EDUSP/FAPESP, 2000. 320 p. p. 235 - 248.

SALA, V. M. R.; FREITAS, S. S.; DONZELI, V. P.; FREITAS, J. G.; GALLO, P. B.; SILVEIRA, A. P. D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, n. 3, p. 345 - 352, 2005.

SALA, V. M. R.; NOGUEIRA, E. J. B.; FREITAS, J. G.; SILVEIRA, A. P. D. Novas bactérias diazotróficas endofíticas na cultura do trigo em interação com a adubação nitrogenada, no campo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 3, p. 1099 - 1106, 2008.

SALERNO, A. R.; SCHALLENBERGER, T. C. H.; STUKER, H. Quebra da dormência em sementes de canafístula. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 9, n. 1, p. 9 - 11, 1996.

SANTOS, C. M. G.; VIEIRA, E. L. Efeito de bioestimulante na germinação de sementes, vigor de plântulas e crescimento inicial do algodoeiro. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 17, n. 3, p. 124 - 130, 2005.

TELES, M. M.; ALVES, A. A.; ANTONIO, J. C. G. O.; BEZERRA, M. E. Métodos para quebra da dormência em sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 387 - 391, 2000.

TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. Impactos potenciais das alterações do Código Florestal nos recursos hídricos. **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 10, n. 4, p. 67 - 76, 2010.

VIECELLI, C. A.; FIORESE, E. J.; RAMPIM, L.; GUIMARÃES, V. F. Quebra da dormência de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng) Taubert) e íris (*Iris germanica*). **Revista de Biologia e Saúde da UNISEP**, Dois Vizinhos, v. 4, n. 2, p. 28 - 35, 2011.