



UFRRJ

UFRRJ

**INSTITUTO DE FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS AMBIENTAIS E FLORESTAIS**

DISSERTAÇÃO

**Estudo de associação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos
arbusculares associados a leguminosas do grupo das piptadenias**

Joel Quintino de Oliveira Júnior

2014

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Curso de Ciências Ambientais e Florestais

Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação (DPPG)

Estudo de associação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos arbusculares associados a leguminosas do grupo das Piptadenias

Joel Quintino de Oliveira Júnior

Sob a orientação do Professor

Dr. Sergio Miana de Faria

e Co-orientação do Pesquisador

Dr Ederson da Conceição Jesus

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais, Área de Concentração em Conservação da Natureza.

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E
FLORESTAIS

JOEL QUINTINO DE OLIVEIRA JÚNIOR

Dissertação aprovada em:

Membros da Banca

Sergio Miana de Faria PhD. Embrapa Agrobiologia
(Orientador)

Ricardo Luis Louro Berbara PhD. UFRRJ

Luiz Fernando Duarte de Moraes D.Sc. Embrapa Agrobiologia

Agradecimentos

Primeiramente a Deus pela sua infinita misericórdia sobre a minha vida e por me presentear com mais uma benção.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Ambientais e Florestais da Universidade pela oportunidade de adquirir conhecimento e experiência de pesquisa e vida profissional, a seus funcionários e professores por toda ajuda e compreensão.

À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida durante o curso.

À Embrapa Agrobiologia pelo suporte no desenvolvimento de todos os experimentos e pela utilização dos laboratórios.

Ao orientador da graduação e agora do mestrado Sergio Miana de Faria pela oportunidade de crescimento profissional e acadêmico.

Ao meu co-orientador Ederson da conceição Jesus por sempre discutir e contribuir com o trabalho, ajudando muito na realização desse sonho.

Aos amigos do Laboratório Isabelly Santos, Maura Santos, Tiago de Bonis, Nathalia Fortuna, Agatha Monteiro e Jairo Tenório, pela grande ajuda no trabalho com os experimentos, pelo companheirismo e paciência comigo.

Aos amigos Técnicos do Laboratório de Leguminosas e de Micorrizas pelo grande apoio nos trabalhos de laboratório.

Aos meus pais Joel Quintino e Alcídia Cardoso, por sempre me apoiar e me incentivar a continuar focado na realização dos meus objetivos e sonhos, orando sempre por mim.

Aos meus amigos da igreja que sempre oram por mim e torcem pelo meu sucesso e prosperidade.

Aos meus irmãos João Carlos e Adrielle Cardoso por sempre mostrar orgulho me incentivando a buscar minha vitória.

Aos amigos da UFRRJ que sempre torceram por mim e mesmo alguns não estando presentes sempre mandando mensagens de conforto.

Se não houver frutos, valeu a beleza das flores; se não houver flores, valeu a sombra das
folhas; se não houver folhas, valeu a intenção da semente.
Henfil

A família Leguminosae compreende um imensa variedade de espécies que formam simbiose com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e, em sua grande maioria, com bactérias fixadoras de nitrogênio. Dentro desse quadro se encaixa o grupo de Piptadenia que engloba os gêneros: *Mimosa*, *Piptadenia*, *Parapiptadenia*, *Anadenathera*, *Pseudopiptadenia*, *Microlobius*, *Stryphnodendron* e *Adenopia*, compreendendo mais de 500 espécies, sendo que a maioria delas é encontrada no novo mundo, em especial no Brasil. Seus hábitos variam desde espécies herbáceas até arbóreas e se desenvolvem em áreas alagadas, secas, campos de altitude, cerrado entre outros ecossistemas. São bem conhecidas e utilizadas na reabilitação de solos degradados por sua agressividade e capacidade de se desenvolver nas mais adversas condições edáficas. Resultados indicam que em algumas espécies desse grupo só nodulariam com a presença de fungos micorrízicos. As leguminosas usam para a realização dessas duas simbioses mecanismos moleculares muito similares e algumas dessas espécies de leguminosas nativas da subfamília Mimosoideae mostram habilidades atípicas e com alto potencial de exploração evolucionária entre as duas simbioses. O objetivo deste trabalho é investigar e confirmar essa dependência da presença de fungos micorrízicos arbusculares para a nodulação e fixação biológica de nitrogênio em espécies do grupo de Piptadenia noduladas por *Burkholderia* sp. sob condições controladas.

Palavras-Chave:

Dependência micorrízica, nodulação, *Burkholderia*, fixação biológica de nitrogênio, fungos micorrízicos arbusculares

Abstract

Leguminosae comprises a wide variety of species that form symbiosis with mycorrhizal fungi (AMF), and mostly with nitrogen fixing bacteria. Within this frame fits the group Pitadenia encompassing genres: Mimosa , Piptadenia , Parapiptadenia , Anadenathera , Pseudopiptadenia , Microlobius , Stryphnodendron and Adenopia , comprising over 500 species, of which most are found in the New World , especially in Brazil . Their habits vary from tree and herbaceous species to thrive in flooded, dry, high altitude grasslands , savanna ecosystems among other areas . Are well known and used in the rehabilitation of degraded soils by their aggressiveness and ability to grow under adverse soil conditions. Results indicate that in some species of this group only nodulated with the presence of mycorrhizal fungi. Legumes use for the realization of these two symbioses very similar molecular mechanisms and some of leguminous species from the subfamily Mimosoideae show atypical and high potential exploration of evolutionary symbiosis between the two skills. The objective of this work is to investigate and confirm this dependence of the presence of arbuscular mycorrhizal fungi for nodulation and nitrogen fixation in species group Piptadenia nodulated by Burkholderia sp . under controlled conditions .

Keywords:

Mycorrhizal dependency , nodulation , Burkholderia , biological nitrogen fixation , mycorrhizal fungi

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Glomerosporo desinfestado superficial com Hipoclorito de sódio a 1% _____	14
Figura 2. Relação entre a massa dos nódulos secos e a massa da parte aérea seca de plantas de <i>Piptadenia gonoacantha</i> do primeiro experimento inoculadas com rizóbios e/ou FMAs. O quadrado e o triângulo representam, respectivamente, as médias de todos os tratamentos para as variáveis massa da parte aérea seca e massa dos nódulos secos. _____	21
Figura 3. Comparação entre os tratamentos que apresentaram os melhores resultados. ____	23
Figura 4. Relação entre a massa dos nódulos secos e a massa da parte aérea seca de plantas de <i>Piptadenia gonoacantha</i> do segundo experimento inoculadas com rizóbios e/ou FMAs. O quadrado e o triângulo representam, respectivamente, as médias de todos os tratamentos para as variáveis massa da parte aérea seca e massa dos nódulos secos. _____	24
Figura 5. Atividade da Enzima Nitrogenase entre tratamentos sem e com a adição do FMA.	25
Figura 6. Relação entre a massa dos nódulos secos e a massa da parte aérea seca de plantas de <i>Piptadenia gonoacantha</i> do terceiro experimento inoculadas com rizóbios e/ou FMAs. O quadrado e o triângulo representam, respectivamente, as médias de todos os tratamentos para as variáveis massa da parte aérea seca e massa dos nódulos secos. _____	27
Figura 7. Comparação entre plantas com e sem Fungos micorrízicos _____	27
Figura 8. Análise comparativa entre as relações MSPA/RAIZ dos tratamentos. Média de três repetições _____	29
Figura 9. Nódulos do Fungo <i>Gigaspora margarita</i> tratado. _____	30
Figura 10. Experimento de <i>Mimosa pudica</i> na casa de vegetação _____	30
Figura 11. Relação de eficiência MNS x MPAS para a espécie <i>Mimosa pudica</i> . _____	33
Figura 12. Relação MSPA/RAIZ no desenvolvimento de <i>Mimosa pudica</i> . Média de três repetições. _____	35

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Influência da dupla inoculação sobre o desenvolvimento de *Piptadenia gonoacantha*. Médias de 3 repetições. Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. _____ 21
- Tabela 2. Influência da dupla inoculação sobre o desenvolvimento de *Piptadenia gonoacantha*. Média de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. A eficácia dos tratamentos inoculados com *G. margarita* e com *D. heterogama* foi calculada com base na testemunha nitrogenada inoculada com cada um desses respectivos fungos. _____ 23
- Tabela 3. Influência da dupla inoculação sobre o desenvolvimento de *Piptadenia gonoacantha*. Média de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. A eficácia dos tratamentos inoculados com *G. margarita* e com *D. heterogama* foi calculada com base na testemunha nitrogenada inoculada com cada um desses respectivos fungos. _____ 28
- Tabela 4. Avaliação da Colonização Micorrízica. Média de 2 repetições. _____ 28
- Tabela 5. Análise da nodulação com adição do fungo micorrízico. Média de três repetições 29
- Tabela 6. Influência da dupla inoculação sobre o desenvolvimento de *Mimosa pudica*. Média de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. A eficácia dos tratamentos inoculados com *G. margarita*, *Rhizophagus clarum* e *D. heterogama* foi calculada com base na testemunha nitrogenada inoculada com cada um desses respectivos fungos. _____ 32
- Tabela 7. Avaliação da Colonização Micorrízica. Média de duas repetições _____ 34

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	2
REFERENCIAL TEÓRICO	3
1. FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMAs)	3
2. ENDOSSIMBIONTES	5
3. BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO	7
4. A INTERAÇÃO TRIPARTITE BACTÉRIA x LEGUMINOSAS x FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR	9
OBJETIVO	12
METODOLOGIA	12
<i>Preparo do inóculo</i>	12
<i>Extração dos Glomerosporos:</i>	13
<i>Desinfestação dos Glomerosporos:</i>	13
<i>Sementes:</i>	14
Experimentos de casa-de-vegetação	14
1º Experimento	14
2º Experimento	15
3º Experimento	16
4º Experimento	17
Análise e Coleta dos Experimentos:	19
RESULTADOS	20
Primeiro experimento com <i>Piptadenia gonoacantha</i>	20
Segundo experimento com <i>Piptadenia gonoacantha</i>	22
Terceiro experimento com <i>Piptadenia gonoacantha</i>	25
Experimento com <i>Mimosa pudica</i>	30
DISCUSSÃO	35
CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

INTRODUÇÃO

Muitos estudos evidenciam a grande diversidade de plantas da família Leguminosae no território brasileiro. Esta família botânica está entre as mais ricas em espécies em biomas brasileiros como a Amazônia e a Mata Atlântica (DUCKE, 1949; BLACK et al., 1950; PRANCE et al., 1976 citados por MOREIRA et al., 1992)

Muitas delas se associam a micro-organismos fixadores de nitrogênio e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) (de FARIA 1987a, 1987b, 1989, 2010; CARNEIRO et al., 1998), os dois principais micro-organismos simbiotes de plantas terrestres. O estudo desta diversidade proporcionou a descoberta de novas espécies de micro-organismos (MOULIN et al., 2001; CHEN et al., 2003) e de novos mecanismos de infecção das plantas por rizóbios (de FARIA et al., 1984)

Virtualmente todas as angiospermas, incluindo as leguminosas, formam associações simbióticas com FMAs, já a fixação biológica de nitrogênio é somente conhecida dentro do clado I Eurosoid nas angiospermas com dois principais tipos: as leguminosas, que apareceram há cerca de 59 milhões de anos, e as actinorrizas, associadas com actinobactérias. A distribuição dessa simbiose entre certos táxons de Rosales, Fagales e Curcubitales aparentemente tem cerca de 70 Ma (SPRENT, 2009).

Sabe-se de longa data que existem interações entre as simbioses de leguminosas com rizóbios e com FMAs (SPRENT, 2009) e algumas espécies de leguminosas nativas da subfamília Mimosoideae mostram habilidades atípicas e com alto potencial de exploração evolucionária entre as duas simbioses. Também já foi relatado na literatura que a micorrização pode contribuir para fixação biológica de nitrogênio e sua captação do solo (BAREA et al., 1987)

Recentemente, descobriu-se que as leguminosas *Piptadenia gonoacantha* e *Piptadenia paniculata*, ambas nativas da mata atlântica (CARVALHO, 2004; disponível em: flora.ipe.org.br/sp/97?pdf=1), não nodulavam em vasos com solo e areia como substrato quando não eram inoculadas com FMAs (JESUS, 2005). Estudos prévios em vasos de Leonard não foram bem sucedidos na seleção estirpes para algumas espécies do grupo *Piptadenia*. Em vasos com solo, foi possível observar que a nodulação ocorria somente

quando a planta era inoculada com FMAs. As plantas inoculadas com rizóbios e FMAs foram as únicas que nodularam e apresentaram crescimento significativamente superior ao daquelas inoculadas apenas com rizóbios. Outros experimentos realizados com espécies aparentadas, todas pertencentes ao grupo Piptadenia (e.g., *Anadenanthera*), apresentaram resultados similares (dados não publicados), indicando este grupo como um grupo com potencial para estudos da interação tripartite leguminosa - rizóbio - FMA.

Este projeto foi concebido no intuito de esclarecer e confirmar essa associação simbiótica no grupo de Piptadenia e possibilitar estudos posteriores sobre quais outros processos estão envolvidos nessa específica simbiose entre *Burkholderia* spp. e espécies desse grupo.

REFERENCIAL TEÓRICO

1. FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMAs)

Os FMAs (filó Glomeromycota) são organismos biotróficos obrigatórios abundantes em solos e ocorrem de forma quase que generalizada na maioria dos ecossistemas vegetais terrestres (BECARD & PICHE 1989; FITTER et al., 2011). São eles os simbiontes mais comuns dentre os vegetais superiores, estabelecendo com eles simbioses denominadas “micorrizas”, com aproximadamente 80% das plantas tendo a capacidade de estabelecer essa associação, sendo ausente em plantas de origem mais recente (SMITH & READ 1997 e 2008, MOREIRA & SIQUEIRA, 2006, SCHÜSSLER et al 2001).

Devido à sua ampla representatividade no ecossistema, os FMAs podem representar quase 50% da biomassa microbiana (OLSSON et al., 1999). O comprimento das hifas que ligam as plantas pode ser superiores a 100 metros por centímetro cúbico de solo (MILLER et al., 1995), especializadas em absorver nutrientes e água. A micorriza se torna, com isso, a associação mais importante entre micro-organismos e plantas (WANG & QIU, 2006) e, conseqüentemente, o principal dreno de fotoassimilados (MORTIMER et al., 2008). O fungo pode drenar aproximadamente 20% dos fotoassimilados produzidos pela plantas (cerca de 5 bilhões de toneladas de carbono por ano) (BAGO et al., 2000).

Depois de formada a simbiose, o fungo promove trocas de fotoassimilados com o vegetal para completar seu ciclo de vida, enquanto seu hospedeiro receberá água e nutrientes inorgânicos absorvidos do solo, especialmente aqueles que apresentam baixa mobilidade,

como o fósforo e zinco, como consequência do aumento do volume de solo explorado, da maior longevidade das raízes, resistência ao estresse hídrico e da proteção contra ataque de patógenos (SMITH & READ, 1997). A capacidade de acessar recursos naturais além do sistema radicular faz com que o vegetal ganhe uma maior capacidade de competição em um ecossistema, contribuindo para a manutenção da biodiversidade vegetal.

Estes fungos podem alterar a produtividade e a competitividade das plantas no ecossistema além de aumentar a diversificação dentro ecossistemas vegetais terrestres. Sua presença no solo também tem sido relacionada a aumentos de produtividade em sistemas agrícolas (ABD-ALLA et al., 2014). Os fungos apresentam uma eficiência variável com a alternância de hospedeiros e do ambiente edáfico devido a uma ampla diversidade genética intrínseca (BRUNDRETT, 1991). Há anos, tem sido comprovado que a inoculação de estirpes selecionadas de FMAs proporciona ganhos de produção consideráveis em condições controladas e de campo (SIEVERDING, 1991; van der HEIJDEN, et al. 1998).

Esses ganhos proporcionados pelo fungo podem mudar entre diferentes isolados da mesma espécie de fungo, bem como pode mudar com diferentes espécies de fungos micorrízicos (CALDEIRA et al., 1997). Esses fungos possuem uma grande importância para os ecossistemas tropicais por se estabelecerem em condições ambientais adversas (FRANCO et al., 1995), pois, de acordo com PARNISKE (2008), a colonização micorrízica é reduzida em ambientes com alta fertilidade.

A formação dessa simbiose tem seu funcionamento ligado a fatores externos, como a disponibilidade de fósforo, o pH, o nível de fertilidade do solo, fatores físicos como umidade/aeração, devido a seu caráter aeróbico, luminosidade e temperatura; interações entre FMAs e outros organismos do solo; aplicação de agrotóxicos; manejo do solo e de culturas; fatores inerentes à planta hospedeira como a compatibilidade desta com o isolado e o grau de dependência micorrízica (grau de micotrofismo da espécie hospedeira) (SIQUEIRA & SAGGIN, 2001; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

O estabelecimento da simbiose tem início a partir da troca de sinais, que se inicia com o contato físico entre os simbioss, seguida da exsudação de compostos capazes de estimular a ramificação das hifas esporofíticas que entram em contato com a raiz. Essas hifas diferenciam-se em apressórios na superfície da raiz e colonizam o tecido cortical, tanto intercelular quanto intracelularmente. No córtex, algumas hifas intracelulares diferenciam-se

em arbúsculos, estruturas responsáveis pela troca de metabolitos entre os simbioses (BONFANTE-FASOLO, 1984; SIQUEIRA, 2010).

Os fungos micorrízicos depois de estabelecidos exercem uma grande função ecológica em habitats ocupados pelas plantas, exercendo uma influência sobre a composição da biodiversidade (FRANCIS & READ, 1995), tendo uma importância sobre a sobrevivência e o funcionamento das comunidades de plantas e ecossistemas (RODRIGUEZ et al., 2004). Alguns estudos sobre comunidades levantaram a questão sobre a determinante influência do fungo micorrízico na biodiversidade vegetal devido a um benefício que o fungo trás, onde ele permite uma maior competição por recursos naturais, evitando, assim, o domínio de uma única espécie (van der HEIJDEN et al., 1998). Essa dominância ocorre em maior frequência em ambientes com seus recursos limitados, como acontece com o fósforo (Flores-Ayala et al., 2003). Assim que a micorriza se estabelece, os benefícios gerados pela simbiose podem variar entre as diferentes espécies de fungos e plantas, desde uma promiscuidade restrita a generalista (POUYU-ROJAS et al., 2006).

A seleção de fungos micorrízicos se faz necessária para assim promover uma melhor simbiose micorrízica. A seleção traz benefícios como: aumentar a produtividade das plantas; facilitar a recuperação de áreas degradadas; reduzir o uso de insumos químicos; melhoria das condições para produção de inoculantes ao se trabalhar com um número de espécies menor e mais eficiente e, assim, contribuir para alcançar uma agricultura mais sustentável e menos dependente de insumos manufaturados.

Nos recentes achados, o fungo micorrízico tem tomado um lugar de destaque em aspectos ecológicos. Embora toda sua importância ainda seja sobre aspectos nutricionais, o papel multifuncional que esse simbiote desempenha nos ecossistemas terrestres é agora reconhecido como sendo também importante (RODRIGUEZ et al., 2004).

2. ENDOSSIMBIOTES

Existe na superfície e no citoplasma dos fungos micorrízicos uma variedade de micro-organismos que interferem de diferentes formas em seu metabolismo, tanto na germinação, na assimilação de nutrientes, na pré-germinação dos esporos ou na colonização das raízes (AZCON et al, 1986; GRYNDLER et al, 1995, BIANCIOTTO et al. 1996, REQUENA et al,

1997, DESIRÒ et al.,2013). Esses microrganismos são denominados como ajudantes de vida livre (*free-living helpers*) (FREY-KLETT et al., 2007).

A coexistência desses fungos com micro-organismos edáficos e sua interação com os vegetais seguem duas linhas de raciocínio (SIQUEIRA, 2010). A primeira linha considera o exemplo do fungo ectomicorrízico *Laccaria bicolor*, que possui uma biota flutuante de bactérias do gênero *Pseudomonas* que diferem entre si dependendo do ambiente (Bertaux et al., 2005). A segunda linha seria um caso de coevolução como supostamente teria acontecido entre o fungo micorrízico arbuscular *Gigaspora margarita* e a bactéria *Candidatus Glomeribacter gigasporarum* (BIANCIOTTO et al., 2004).

Em 1970 com Mosse começaram estudos em fungos micorrízicos com endossimbiontes. Os estudos se iniciaram baseados em observações feitas através de microscopia eletrônica. A partir disso, descobriu-se que o citoplasma de um esporo é mais complexo do que se imaginava e que ele aporta endossimbiontes com características morfológicas, ciclos de vida diferentes e diferente localização no citoplasma do esporo (DESIRÒ et al., 2013). Dois tipos de micro-organismos são conhecidos: a primeira *Candidatus Glomeribacter gigasporarum* (CaGg), tem forma de bastonete gram-negativo e pertence à classe β -Proteobacteria (BONFANTE et al., 1994), está presente em várias espécies da família Gigasporaceae (BIANCIOTTO et al, 2003, DESIRÒ et al., 2013); a segunda é uma endobactéria denominada *bacteria-like organisms* (BLOs) e são cocos gram-positivos, (SCANNERINI & BONFANTE, 1991, DESIRÒ et al.,2013), recentemente classificados em um táxon relacionado com Mollicutes (MRE) e que possui uma ampla distribuição dentro do filo Glomeromycota (NAUMANN et al., 2010).

A endobactéria *Candidatus Glomeribacter gigasporarum* tem sido estudada com mais detalhes. No genoma dessa bactéria foi encontrado um mosaico de genes determinantes que atribuem a essa endobactéria características simbióticas, saprofíticas e patogênicas (GHIGNONE et al, 2012). Em um estudo desenvolvido por LUMINI et al., (2007), a partir de um filiação de fungos, ele comprovou que a bactéria pode sofrer uma diluição e ser retirada do sistema com o passar das gerações, a partir da quinta o fungo estaria estéril. Porém, a eliminação da bactéria provoca uma série de reflexos no comportamento fisiológico do fungo micorrízico alterando por exemplo seu desenvolvimento e a ramificação das hifas.

A grande barreira no estudo de "*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*" consiste no fato de que essa bactéria não crescer em meios de cultura, isolada do envoltório fornecido pelo *Gigaspora margarita* (JARGEAT et al, 2004). A forma como ela foi adquirida pelo fungo, o mecanismo evolutivo paralelo e a distinção entre um endossimbionte cíclico e um permanente, ainda não estão claras. Existem duas possibilidades: a primeira seria que o fungo assimilou a bactéria que estaria presente em sua rizosfera e, assim, foi transmitida verticalmente através das gerações; a segunda seria que a associação entre o fungo e uma bactéria de vida livre simplesmente evoluiu de temporária para permanente (SANDERS, 1999).

Esses achados abrem portas para a possível domesticação das bactérias pelos fungos que estão em constante evolução tanto na diversidade e taxonomia principalmente nas regiões tropicais. Essas relações simbióticas intracelulares envolvem grandes questões sobre a aquisição, a dinâmica e a relação evolutiva entre o simbionte e o hospedeiro (FUTUYMA et al. 1983), o que nos leva a discutir sobre sua dependência e quais seriam as funções ecológicas dessas bactérias.

3. BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO

A simbiose entre as bactérias fixadoras de nitrogênio e leguminosas é a principal forma de entrada de nitrogênio em ambientes naturais. Além disso, é a forma agrônômica mais barata e eficaz para assegurar um suprimento adequado de nitrogênio às plantas, evitando a aplicação de fertilizantes nitrogenados e o risco do seu uso (MIA & SHAMSUDDIN, 2010).

A Fixação Biológica do Nitrogênio é o aprisionamento de nitrogênio atmosférico e sua remodelagem em uma forma assimilável para a planta (BROUGHTON et al., 2006; MARIN et al., 2007), promovida por micro-organismos simbiontes ou de vida livre, conhecidos como dizotróficos ou fixadores de nitrogênio. São indivíduos procariotos e utilizam para a fixação a enzima conhecida como nitrogenase (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Essa enzima é sensível ao oxigênio, que pode inativá-la irreversivelmente. Essa reação é endergônica, isto é, a energia é necessária para que ela ocorra em sistemas biológicos, essa energia é fornecida na forma de ATP (YOUNG, 1996).

O início da simbiose ocorre através de uma emissão de sinais químicos. As raízes das plantas excretam flavonóides que ativam expressão de genes reguladores da nodulação (Perret et al., 2000). O complexo Nod-flavonoides irá interagir com uma região promotora conservada (*Nod boxes*) localizada após os genes Nod no genoma da bactéria. Em seguida, ocorrerá a transcrição dos genes nod e sua expressão levará a síntese e liberação dos fatores de Nod (Lipo-quito-oligossacarídeos) (BROUGHTON et al., 2006) que possuem um papel chave no processo inicial da nodulação (LONG, 1996; ALBRECHT et al., 1999). Após o reconhecimento entre a bactéria e seu hospedeiro ocorre a formação do cordão de infecção, pelo qual penetram os rizóbios que se instalam no córtex radicular onde já se iniciou o processo de divisão celular para a formação do nódulo. Algumas espécies primitivas tem o cordão infeccioso e persistente, dessa forma ele não libera bactérias no interior da célula, e a penetração pode ocorrer por fissuras nas raízes, ao invés de ser por um cordão de infecção (FARIA et al., 1986). Hoje já é conhecido que durante a colonização dessas bactérias nem o processo de infecção via pêlos radiculares, nem a liberação de fatores de nodulação são estágios obrigatórios para o estabelecimento da simbiose com leguminosas (Sprent 2009, Giraud et al 2007). Essa simbiose, depois de estabelecida, pode dar origem a nódulos efetivos, sendo classificada como simbiose mutualística ou pode dar origem a nódulos inefetivos, sendo, então, classificada como parasítica (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

A FBN não é um processo realizado constantemente pelos organismos fixadores, mas ocorre apenas quando for insuficiente a concentração de nitrogênio fixado, pois o gasto de energia para FBN é alto. Além disso, esse processo só pode ocorrer quando a concentração de O₂ for baixa, pois este pode inativar a nitrogenase (GONÇALVES, 1999; OLIVEIRA, 2011).

Dentre as Leguminosas descritas, uma pequena fração foi estudada quanto a sua capacidade de nodulação. Nos últimos anos ocorreram inúmeras descrições de simbiontes provenientes de regiões tropicais e esses estudos revelaram a existência de enorme diversidade de simbiontes. Até o ano 2000, acreditava-se que as estirpes capazes promover a nodulação em leguminosas eram apenas membros das alfaproteobactérias. Porém, MOULIN et al . (2001) e CHEN et al. (2001) descobriram em nódulos de leguminosas tropicais bactérias dos gêneros *Burkholderia* e *Ralstonia* (posteriormente reclassificada como *Cupriavidus*), que pertencem à classe β -Proteobacteria.

A partir deste ponto houve um número crescente de estudos que constataram novas estirpes nodulíferas pertencentes a classe das beta-proteobactérias (CHEN *et al.*, 2003; BARRETT & PARKER, 2005). A maioria destes estudos foi realizado em leguminosas tropicais, sugerindo assim que a diversidade atual de bactérias nodulíferas para leguminosas é largamente subestimada. Esta nova descoberta é principalmente importante para o gênero *Burkholderia*, pois parecer ser bastante específico para espécies do grupo das Piptadenias (BOUNAUD, 2012).

4. A INTERAÇÃO TRIPARTITE BACTÉRIA x LEGUMINOSAS x FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR

Estudos determinaram que a interação micorrízica tenha cerca 400 Ma (BONFANTE & GENRE, 2008). A nodulação tem data mais recente, surgindo há cerca de 59 Ma atrás (GENRE *et al.*, 2005, BONFANTE & ANCA, 2009, MARKMANN & PARNISKE, 2009, KISTNER & PARNISKE, 2002, SPRENT, 2009).

A simbiose que entre a bactéria e a leguminosa capaz de fazer a Fixação Biológica de nitrogênio está restrita a um pequeno grupo de plantas, limitadas a quatro ordens (Fagales, Fabales, Rosales e Cucurbitales), é capaz de fixar o nitrogênio através de nódulos formados em associação com bactérias. Este grupo compreende a maior parte das 20.000 espécies de leguminosas e algumas espécies do gênero *Parasponia* (Cannabaceae) capazes de interagir com Alfa-proteobactérias e Beta-protobactérias (MOULIN *et al.*, 2001), chamados coletivamente rizóbios. Outro grupo são as plantas actinorrízicas com 280 espécies capazes de interagir com actinobactérias filamentosas Gram-positivas do gênero *Frankia* (VESSEY *et al.*, 2005; PERRINE-WALKER *et al.*, 2011).

A simbiose entre o fungo e a planta que gera a micorriza arbuscular possui um fato interessante, que é encontrar dentro dessa simbiose 200 mil plantas sendo colonizadas por um pouco mais de 215 espécies de fungos micorrízicos, que são distribuídos em dezenove gêneros, treze famílias e quatro ordens (SIQUEIRA, 2010). Análises moleculares concluíram que uma mesma espécie de planta pode ser colonizada por 20 espécies diferentes de Fungos (FITTER, 2005).

É possível que pequenas diferenças manifestadas na restrição destes parceiros contribuam para reduzida diversidade dos fungos, em comparação com a ampla diversidade de espécies hospedeiras. Considerando ser o hábito micotrófico comum nas plantas tropicais, diferenciando a forma de colonização radicular (VOETS *et al.*, 2006), poucas combinações

fungo-planta foram estudadas, razão pela qual as micorrizas arbusculares são consideradas sem especificidade hospedeira. Mas já existem relatos que a taxa de micorrização teria sido diferente entre algumas espécies testadas (LAND et al., 1993; GOMIDE et al., 2009)

A proximidade entre Bactérias fixadoras de Nitrogênio e os Fungos Micorrízicos Arbusculares se inicia de uma forma geral já pelo grande beneficiamento da bactéria na presença do fungo micorrízico, tendo a habilidade de proporcionar um aumento na fixação (FOUGNIES et al., 2006). O processo de fixação biológica de nitrogênio exige uma grande demanda de energia, que é fornecida pela planta para bactéria na forma de ATP. A grande deficiência de fósforo em solos tropicais é limitante para o máximo desenvolvimento da simbiose. A micorriza tem o papel de melhorar a absorção desse nutriente. Existe também o efeito produzido pela presença da bactéria na rizosfera, causando um aumento na micorrização (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006, AMES & BETHLENFALVAY, 1987; AZCÓN et al., 1991; BOUNAUD, 2012).

A ligação entre as duas formas de simbiose fica evidente pela concentração de fósforo encontrado nos nódulos ser superior em três vezes àquela de outros órgãos (VADEZ, 1997). Esta ligação também se atribui ao número de genes e exsudatos radiculares que as simbioses compartilham em seu estabelecimento. Essas evidências levantam a hipótese de que as simbioses formadas com espécies da família das leguminosas citadas possam ter sido herdadas de fungos micorrízicos. Já que se trata de duas formas de simbiose que surgiram em épocas distintas.

Existem uma grande intercessão entre as simbioses, de modo que elas compartilham similaridades nas etapas pré simbiótica e simbiótica a nível genético, como no reconhecimento dos sinais químicos com o gene SYMRK (SPRENT, 2009; STRACKE et al., 2002); o gene posterior DMI1, que codifica um canal de cátions putativo envolvido na oscilação da concentração de Ca^{+2} (ENDRE et al., 2002); e o gene DMI3 que codifica quinases de proteínas dependentes de cálcio e calmodulina de localização nuclear (LAMBAIS, 2006). Outra similaridade é o gene CYCLOPS, que atua na rota de sinalização das simbioses, promovendo barreiras para a formação de arbúsculos e do cordão de infecção em mutantes desse gene (PARNISKE, 2008).

A evidência mais convincente de que as simbioses com rizóbios e FMAs possuem etapas em comum são os estudos feitos com leguminosas mutantes. Estes estudos mostram

que leguminosas que perderam sua capacidade de nodulação tiveram o estabelecimento da simbiose com FMAs interrompido em diferentes etapas, dependendo do gene afetado (GIANINAZZI-PEARSON, 1996). Em um dos fenótipos mutantes (Myc^{-1}), a diferenciação da hifa em apressório ocorreu normalmente, porém sem a penetração das hifas nas raízes. Em outro fenótipo ocorreram a penetração e a colonização das raízes pelas hifas, porém sem a sua diferenciação em arbúsculos (GIANINAZZI-PEARSON, 1996). Adicionalmente, genes expressos especificamente no nódulo, conhecidos como genes NOD e ENOD, e que controlam processos como a organogênese, a invasão do nódulo pelas bactérias e, também, seu funcionamento, foram demonstrados como sendo expressos em plantas infectadas por FMAs (GIANINAZZI-PEARSON, 1996; FRÜLING et al., 1997; ALBRECHT et al., 1999).

Outro fator que pode impedir a formação das simbioses seria o fator nutricional. Com a disponibilidade de N e P em altos níveis, a planta regulará negativamente para ambos os casos (SIQUEIRA et al, 2010; OLIVEIRA JÚNIOR, 2011). Esses níveis tanto de N quanto de P, quando elevados, poderão suprimir a simbiose. Esse fator nutricional irá variar observando que os valores ótimos para a ocorrência da simbiose em relação da leguminosa quanto do FMA ou do rizóbio. Existe um controle chamado de autorregulação que funciona com o objetivo de evitar uma nodulação excessiva por parte da bactéria, cada nódulo formado irá suprimir sistemicamente a formação de outros nódulos.

A compatibilidade funcional entre a bactéria e o FMA é um fator que pode modificar também a eficiência da simbiose, pois a combinação feita entre o FMA e a estirpe inoculada poderá reduzir ou aumentar a eficiência de determinada estirpe (SIQUEIRA et al, 2010, BOUNAUD, 2012). Isso fica evidenciado no trabalho feito pelos autores THIAGARAJEN & AHMAD (1993), onde o FMA torna as estirpes inoculadas mais eficientes na competição pelo sítio de infecção com as estirpes nativas do solo, tornando maior a presença da estirpe inoculada na ocupação dos nódulos.

As propriedades físicas do solo podem afetar a simbiose, reduzindo a colonização pelo FMA e também geram uma queda na eficiência da fixação biológica de nitrogênio. Essa influência negativa variará de espécie para espécie, tanto de leguminosa como de FMA ou rizóbio. A classe de solo e a textura são algumas das características edáficas que podem influenciar na simbiose tripartite (SIQUEIRA et al, 2010).

Devido a todos os benefícios gerados, a perfeita combinação torna possível manter a biodiversidade encontrada entre os vegetais. E faz a natureza ser autossustentável quando em perfeito equilíbrio. Com a exploração excessiva dos recursos naturais feita pelo homem torna mais importante o estudo dessas formas de simbiose. Para evitar que se percam as áreas já exploradas e conseqüente ocorrerá uma melhora nas técnicas de recuperação dessas áreas, sendo assim mais eficientes e rápidas, com a intenção de manter o planeta ainda funcionando com saúde.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi investigar e confirmar a dependência da presença de fungos micorrízicos arbusculares para a nodulação e fixação biológica de nitrogênio em espécies do grupo de *Piptadenia* noduladas por *Burkholderia* spp. sob condições controladas.

METODOLOGIA

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação localizada na Embrapa Agrobiologia, Seropédica/RJ. Foram feitos quatro experimentos com leguminosas de hábitos diferentes: *Piptadenia gonoacantha*, uma arbórea, e *Mimosa pudica*, uma escandente. As sementes de *P. gonoacantha* foram adquiridas do viveiro florestal da Prefeitura do estado do Rio de Janeiro localizado em Guaratiba. As semente da espécie *Mimosa pudica* foram coletadas em indivíduos localizados na área da Embrapa Agrobiologia.

Preparo do inóculo

As estirpes BR4802, BR4812, BSP1, BR3510 e BR3486, previamente selecionadas com base na descrição dos hospedeiros, foram crescidas por dois dias em meio TY líquido, a 28°C e 150 RPM. Após esse período, as culturas foram centrifugadas, a 10000 rpm e a 4°C, por 10 minutos. O pellet foi ressuspensionado em uma solução de 10 mM de sulfato de manganês (MgSO₄.7H₂O). Essa etapa de centrifugação foi repetida por 3 vezes. A densidade ótica das estirpes foi ajustada para 1.0, correspondendo a, aproximadamente, 10⁸ células por mililitro.

Extração dos Glomerosporos:

Os inóculos de FMA foram obtidos da Coleção de Fungos Micorrízicos Arbusculares da Embrapa Agrobiologia (COFMEA). Três espécies foram selecionadas: *Gigaspora margarita*, *Dentiscutata heterogama* e *Rhizophagus clarum*.

A extração dos glomerosporos seguiu os passos descritos segundo a metodologia de peneiramento úmido (Gedermann & Nicolson, 1963) e centrifugação com sacarose (Daniels & Skipper, 1982). Estes foram separados em placa Petri com o auxílio de uma lupa estereoscópica e verificada a pureza dos inóculos.

A aplicação dos esporos no experimento foi feita através de uma diluição dos esporos extraídos em água destilada. Onde foi padronizada uma quantidade de 50 esporos por ml. Foi aplicado 1ml dessa solução em cada vaso.

Desinfestação dos Glomerosporos:

A desinfestação dos Glomerosporos seguiu a metodologia descrita por Colozzi-filho (1994), que se utiliza de uma solução de hipoclorito de sódio 1%, por 12 minutos, com posterior lavagem com água destilada. Os esporos desinfestados foram mantidos por uma semana em placas com meio 79 (Vincent, 1970) para verificar a eficiência da desinfestação.



Figura 1. Glomerosporo desinfestado superficial com Hipoclorito de sódio a 1%

Sementes:

As sementes receberam tratamentos diferenciados para a melhor germinação. A espécie *Mimosa pudica* exigiu imersão das sementes em ácido sulfúrico 98% por 15 minutos para a quebra de dormência. As sementes de *Piptadenia gonoacantha* não passaram por esse tratamento pela ausência de dormência tegumentar.

As sementes de ambas as espécies passaram por um tratamento de desinfestação superficial com peróxido de hidrogênio 30%, por 2 minutos, sendo, posteriormente, germinadas em placas de petri com papel filtro e algodão durante quatro dias.

Experimentos de casa-de-vegetação

1º Experimento

O experimento foi montado com a espécie *Piptadenia gonoacantha*, no delineamento inteiramente casualizado, com nove tratamentos e quatro repetições. O experimento foi composto de tratamentos inoculados com uma espécie de fungos micorrízico, com as estirpes de bactérias e com uma combinação entre os dois micro-organismos (fungo micorrízico + estirpes). Além desses, foram inseridos os controles, a saber, uma testemunha absoluta e uma testemunha nitrogenada.

Assim, os tratamentos foram:

1. Inoculação com a estirpe BR4802
2. Inoculação com a estirpe BR4812
3. Inoculação com *Gigaspora margarita* não esterilizado
4. Inoculação com *Gigaspora margarita*
5. Inoculação com *Gigaspora margarita* e com a estirpe BR4802
6. Inoculação com *Gigaspora margarita* e com a estirpe BR4812
7. Inoculação com *Gigaspora margarita* tratado
8. Testemunha Absoluta
9. Testemunha Nitrogenada

Onde BR4802 e BR4812 são as estirpes de *Burkholderia* sp. O fungo micorrízico utilizado foi o *Gigaspora Margarita* W.N. Becker & I.R. Hall (Gig.marg).

O experimento foi montado em casa de vegetação em vasos de Magenta contendo areia e vermiculita estéreis na proporção 1:1 (v:v) e solução nutritiva da França livre de nitrogênio (anexo), utilizando a espécie *Piptadenia gonoacantha*. As sementes foram inoculadas com 10^8 células de cada estirpe de bactéria e com os fungos micorrízicos. Os controles nitrogenados receberam, até o final do experimento, 100mg de N/planta de solução de nitrato de amônio. O experimento foi coletado 120 dias após a semeadura.

2° Experimento

O experimento foi montado com a espécie *Piptadenia gonoacantha*, no delineamento inteiramente casualizado, com onze tratamentos e quatro repetições. O experimento foi composto de tratamentos inoculados com fungo micorrízico, com as estirpes de bactérias e com uma combinação entre os dois micro-organismos (fungo micorrízico + estirpes). Além desses, foram inseridas vários controles, a saber, uma testemunha absoluta, uma testemunha nitrogenada, e testemunha nitrogenada com FMA.

Assim, os tratamentos foram:

1. Inoculação com a estirpe BR4802
2. Inoculação com a estirpe BR4812

3. Inoculação com *Gigaspora margarita* e com a estirpe BR4802
4. Inoculação com *Gigaspora margarita* e com a estirpe BR4812
5. Inoculação com *Gigaspora margarita* não esterilizado
6. Inoculação com *Gigaspora margarita*
7. Inoculação com *Gigaspora margarita* tratado
8. Inoculação com *Gigaspora margarita* tratado e *Gigaspora margarita* não tratado
9. Testemunha Nitrogenada
10. Inoculação com *Gigaspora margarita* e adição de N mineral
11. Testemunha Absoluta

Onde BR4802 e BR4812 são as estirpes de *Burkholderia* sp. O fungo micorrízico utilizado foi o *Gigaspora Margarita* W.N. Becker & I.R. Hall (Gig.marg).

O experimento foi montado em casa de vegetação em vasos de Magenta contendo areia e vermiculita estéreis na proporção 1:1 (v:v) e solução nutritiva de Hoagland esterilizadas, utilizando a espécie *Piptadenia gonoacantha*. As sementes foram inoculadas com 10^8 células de cada estirpe de bactéria e com os fungos micorrízicos. Os controles nitrogenados receberam, até o final do experimento, 100 mg de N/planta de solução de nitrato de amônio. O experimento foi coletado 150 dias após a semeadura.

3º Experimento

O experimento foi montado com a espécie *Piptadenia gonoacantha*, no delineamento inteiramente casualizado, com 18 tratamentos e 4 repetições. O experimento foi composto de tratamentos inoculados com fungos micorrízicos, com as estirpes de bactérias e com uma combinação entre os dois micro-organismos (fungos micorrízicos + estirpes). Além desses, foram inseridas vários controles, a saber, uma testemunha absoluta, uma testemunha nitrogenada, e testemunha nitrogenada com FMA.

Assim, os tratamentos foram:

1. Inoculação com a estirpe BR4802
2. Inoculação com a estirpe BSP1
3. Inoculação com *Gigaspora margarita* e com a estirpe BR4802

4. Inoculação com *Gigaspora margarita* e com a estirpe BSP1
5. Inoculação com *Gigaspora margarita* não esterilizado
6. Inoculação com *Gigaspora margarita*
7. Inoculação com *Gigaspora margarita* tratado
8. Inoculação com *Gigaspora margarita* tratado não estéril
9. Inoculação com *Gigaspora margarita* tratado e *Gigaspora margarita* não tratado
10. Inoculação com *Dentiscutata heterogama*
11. Inoculação com *Dentiscutata heterogama* não esterilizado
12. Inoculação com *Dentiscutata heterogama* e com a estirpe BR4802
13. Inoculação com *Dentiscutata heterogama* e com a estirpe BSP1
14. Inoculação com *Dentiscutata heterogama* tratado
15. Inoculação com *Dentiscutata heterogama* tratado e *Dentiscutata heterogama* não tratado
16. Inoculação com *Dentiscutata heterogama* e aplicação de N mineral
17. Inoculação com *Gigaspora margarita* e aplicação de N mineral
18. Testemunha Absoluta

Onde BR4802 e BR4812 são as estirpes de *Burkolderia* sp. O fungo micorrízico utilizado foi o *Gigaspora Margarita* W.N. Becker & I.R. Hall (Gig.marg), *Dentiscutata heterogama* (Dent.het).

O experimento foi montado em casa de vegetação em vasos de Magenta contendo areia e vermiculita estéreis na proporção 1:1 (v:v) e solução nutritiva de Hoagland esterilizadas, utilizando a espécie *Piptadenia gonoacantha*. As sementes foram inoculadas com 10^8 células de cada estirpe de bactéria e com os fungos micorrízicos. Os controles nitrogenados receberam, até o final do experimento, 70 mg de N/planta de solução de nitrato de amônio. O experimento foi coletado 77 dias após a semeadura.

4º Experimento

O experimento foi montado com a espécie *Mimosa pudica*, no delineamento inteiramente casualizado, com 17 tratamentos e 4 repetições. O experimento foi composto de tratamentos inoculados com fungos micorrízicos, com as estirpes de bactérias e com uma

combinação entre os dois micro-organismos (fungos micorrízicos + estirpes). Além desses, foram inseridas vários controles, a saber, uma testemunha absoluta, uma testemunha nitrogenada, e testemunha nitrogenada com FMA.

Assim, os tratamentos foram:

1. Inoculação com a estirpe BR3510
2. Inoculação com a estirpe BR3486
3. Inoculação com *Gigaspora margarita* e inoculação com a estirpe BR3486
4. Inoculação com *Gigaspora margarita* e inoculação com a estirpe BR3510
5. Inoculação com *Gigaspora margarita*
6. Inoculação com *Gigaspora margarita* tratado
7. Inoculação com *Gigaspora margarita* tratado não estéril
8. Inoculação com *Rhizophagus clarum* e inoculação com a estirpe BR3510
9. Inoculação com *Rhizophagus clarum* e inoculação com a estirpe BR3486
10. Inoculação com *Rhizophagus clarum*
11. Inoculação com *Dentiscutata heterogama*
12. Inoculação com *Dentiscutata heterogama* e inoculação com a estirpe BR4802
13. Inoculação com *Dentiscutata heterogama* e inoculação com a estirpe BSP1
14. Inoculação com *Dentiscutata heterogama* tratado
15. Inoculação com *Dentiscutata heterogama* e adição de N mineral
16. Inoculação com *Rhizophagus clarum* e adição de N mineral
17. Inoculação com *Gigaspora margarita* e adição de N mineral
18. Testemunha Absoluta

Onde BR3510 e BR3486 são as estirpes de *Burkolderia* sp. Os fungo micorrízicos utilizados foram o *Gigaspora Margarita* W.N. Becker & I.R. Hall (Gig.marg), *Rhizophagus clarum* (Rhi.cla) e o *Dentiscutata heterogama* (Dent.het).

O experimento foi montado em casa de vegetação em vasos de 2kg de polietileno, utilizando-se areia e vermiculita estéreis, na proporção 1:1 (v:v), como substrato e solução nutritiva da França livre de nitrogênio(anexo). A aplicação da solução nitrogenada iniciou se após um crescimento mais uniforme e a queda observada diariamente dos cotilédones. A dose foi aumentada em resposta ao desenvolvimento das plantas. O experimento foi coletado 98 dias após a semadura plantio conduzido em casa de vegetação estéril.

Análise e Coleta dos Experimentos:

As seguintes variáveis foram avaliadas após as coletas do experimento: massa da parte aérea seca, massa das raízes secas, massa dos nódulos secos e taxa de micorrização. Os dados foram submetidos a análises de variância e as médias foram comparadas com o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade com auxílio do programa SISVAR.

A eficiência de cada tratamento inoculado foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência} = \frac{(\text{MPAS trat})}{(\text{MPAS testabs})} \times 100$$

Onde:

MPAS tratamento: massa da parte aérea seca do tratamento inoculado;

MPAS testemunha absoluta: massa da parte aérea seca da testemunha absoluta;

E a eficácia de cada tratamento inoculado foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Eficácia} = \frac{(\text{MPAS trat})}{(\text{MPAS testnitr})} \times 100$$

Onde:

MPAS: tratamento: massa da parte aérea seca do tratamento inoculado;

MPAS: testemunha com nitrogênio mineral: massa da parte aérea seca da testemunha nitrogenada.

Para calcular a eficiência serão utilizados os dados de massa de parte aérea seca de cada tratamento inoculado em comparação com a massa da testemunha absoluta que não recebeu nenhum tratamento. Para calcular a eficácia será utilizada a massa de parte aérea seca

de cada tratamento inoculado em comparação com a testemunha nitrogenada que induziu o maior incremento de massa (de FARIA, 2000).

A colonização das raízes foi avaliada em amostras de raízes finas clarificadas e coradas de acordo com o método utilizado por KOSKE & GEMMA (1989).

Na determinação da atividade da nitrogenase, utilizou-se o método de análise de redução de acetileno (ARA) adaptado (MAGUE & BURRIS, 1972; HARDY et al., 1968), tendo-se incubado por 30 minutos as raízes noduladas em recipientes de vidros hermeticamente fechados, aplicando um volume de gás equivalente a 10% da atmosfera do frasco. Após este período, coletou-se 1 mL de gases do interior dos recipientes, e detectou-se o etileno produzido, em um cromatógrafo gasoso com detecção por ionização de chama.

RESULTADOS

Primeiro experimento com *Piptadenia gonoacantha*

As plantas inoculadas nodularam apenas com a estirpe BR4802. Neste caso, a nodulação ocorreu independentemente da presença do fungo micorrízico arbuscular (FMA), contrariando a hipótese inicial de que a planta depende do fungo micorrízico para sua nodulação. Cabe destacar que as plantas inoculadas com o fungo tratado também não nodularam.

A diferença entre os tratamentos não foi significativa ao nível de confiança de 95% (Anexo). A ausência de significância pode ter sido influenciada pelo elevado coeficiente de variação (28,34%). Ainda assim, pode-se observar que os tratamentos proporcionaram um aumento considerável no acúmulo de massa seca das plantas, em especial os tratamentos de inoculação com *G. margarita* e de co-inoculação de *Gigaspora margarita* com a estirpe de BR4802, conforme evidenciado pelos valores de eficiência e eficácia, que comparam os tratamentos às testemunhas absoluta e nitrogenada, respectivamente. As plantas inoculadas com *G. margarita* e BR4802 apresentaram um crescimento 136,20% superior ao das plantas não inoculadas e quase 100% superior ao daquelas que receberam N mineral (Tabela 1).

No que diz respeito às taxas de micorrização, estas foram baixas, sendo, respectivamente, de 9% e 3% (média de 3 repetições) nas plantas inoculadas ou não com a estirpe BR4802. Os demais tratamentos inoculados com FMAs não apresentaram colonização.

Tabela 1. Influência da dupla inoculação sobre o desenvolvimento de *Piptadenia gonoacantha*. Médias de 3 repetições. Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TRATAMENTOS	MSPA(mg)	MNS(mg)	Eficiência(%) ¹	Eficácia(%) ²
Testemunha abs	12,32a	0,00b	100,00	84,62
Test Nitrogenada	14,56a	0,00b	118,18	100,00
BR4812	15,23a	0,00b	123,62	104,60
Gig.marg Tratado	16,11a	0,00b	130,68	110,58
Gig.marg+ BR4812	16,64a	0,00b	135,06	114,29
BR4802	17,31a	106,53a	140,42	118,82
Gig.marg	20,46a	0,00b	166,07	140,52
Gig.mar+ BR4802	29,11a	162,06a	236,20	199,86
CV(%)	28,34	69,01		

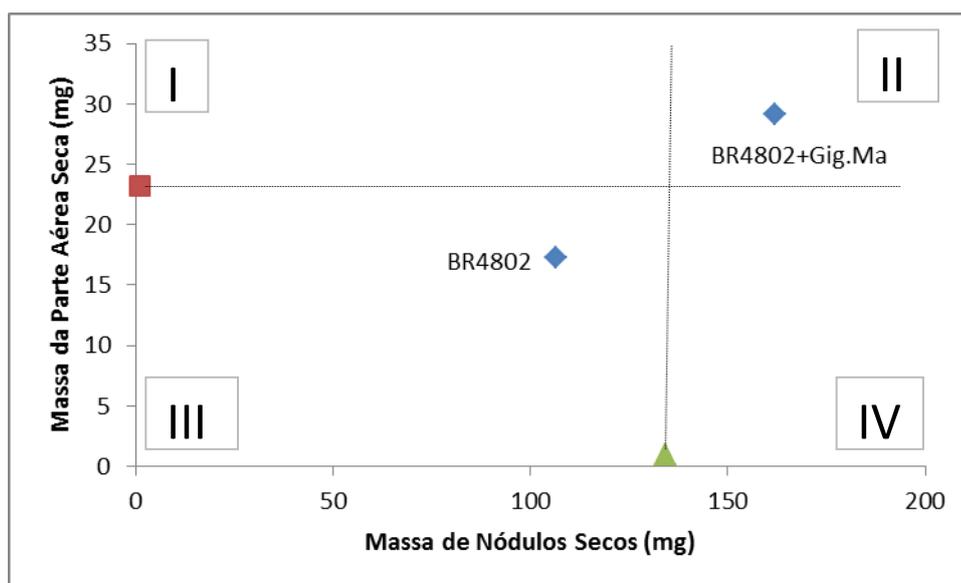


Figura 2. Relação entre a massa dos nódulos secos e a massa da parte aérea seca de plantas de *Piptadenia gonoacantha* do primeiro experimento inoculadas com rizóbios e/ou FMAs. O

quadrado e o triângulo representam, respectivamente, as médias de todos os tratamentos para as variáveis massa da parte aérea seca e massa dos nódulos secos.

Apesar desses baixos valores de colonização, as plantas que foram inoculadas com *Gigaspora margarita* + BR4802 apresentaram maior nodulação do que aquelas não inoculadas com esse FMA. A massa de nódulos superior proporcionou uma maior eficiência para o tratamento e, conseqüentemente, um maior ganho de massa da parte aérea seca (Figura 2).

Segundo experimento com *Piptadenia gonoacantha*

Ao contrário do que foi observado no primeiro experimento, observou-se neste experimento diferença significativa entre os tratamentos ao nível de confiança de 99% (anexo).

Similar ao que foi observado no primeiro experimento, não foram encontrados nódulos no tratamento inoculado com a estirpe BR4812. As plantas inoculadas nodularam apenas com a estirpe BR4802. Novamente, a nodulação ocorreu independentemente da presença do fungo micorrízico arbuscular e as plantas inoculadas com o fungo tratado também não nodularam. Contudo, os nódulos das plantas duplamente inoculadas apresentaram atividade da nitrogenase 10 vezes maior, o que pode ter se refletido no maior acúmulo de massa seca desse tratamento, conforme apresentado a seguir (Figura 2).

O tratamento com o maior acúmulo de massa seca na parte aérea foi aquele em que as plantas receberam a dupla inoculação de *G. margarita* e da estirpe BR4802. As médias desse tratamento não diferiram significativamente das médias do tratamento de inoculação com a estirpe BR4802 somente e da testemunha nitrogenada inoculada com *G. margarita*, porém cabe destacar que a co-inoculação se refletiu num maior crescimento vegetal das plantas, o que é evidenciado pela maior eficiência desse tratamento (Tabela 3 e Figura 5). O acúmulo de massa seca da parte aérea no tratamento de dupla inoculação foi 372,75% superior ao da testemunha absoluta, enquanto os outros dois tratamentos foram, respectivamente, superiores à testemunha em 172,27 e 90,81%. Estes dois últimos tratamentos também não diferiram significativamente dos demais, apresentando desempenho intermediário. As plantas

responderam à adubação nitrogenada somente na presença do fungo micorrízico arbuscular (Tabela 3).

No que diz respeito às taxas de micorrização, estas foram baixas, porém com valores superiores aos encontrados no experimento anterior. Os valores foram 12, 18 e 28% para os tratamentos inoculados com *G. margarita*, com e sem N, e co-inoculado com *G. margarita* e a estirpe BR4802, respectivamente. A colonização não seguiu um padrão, tendo um maior valor no tratamento *Gigaspora margarita* + BR4802.

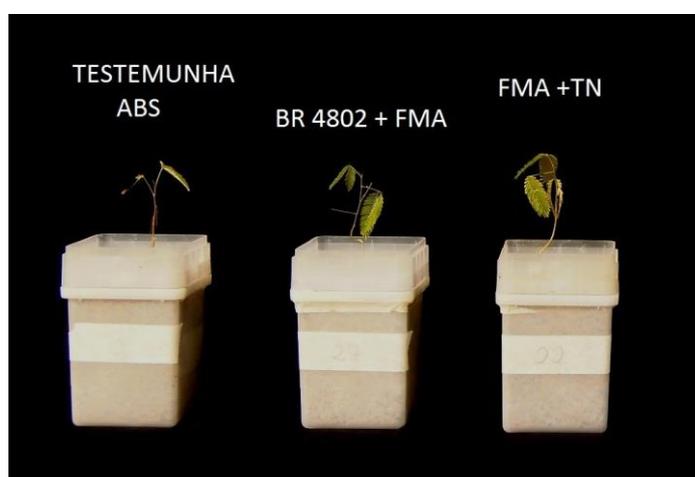


Figura 3. Comparação entre os tratamentos que apresentaram os melhores resultados.

Tabela 2. Influência da dupla inoculação sobre o desenvolvimento de *Piptadenia gonoacantha*. Média de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. A eficácia dos tratamentos inoculados com *G. margarita* e com *D. heterogama* foi calculada com base na testemunha nitrogenada inoculada com cada um desses respectivos fungos.

TRATAMENTOS	MPAS(mg)	MNS(mg)	Eficiência(%) ¹	Eficácia(%) ²
Gig.marg + BR4812	20,00 b	0,00 b	39,45	18,18
BR 4812	30,00 b	0,00 b	65,4	27,27
Gig.marg Tratado	30,00 b	0,00 b	71,56	27,27
Gig.marg	40,00 b	0,00 b	92,89	36,36
Testemunha abs	40,00 b	0,00 b	100	36,36
Test Nitrogenada	50,00 b	0,00 b	119,67	45,45
BR 4802	90,00 ab	14,12 a	190,81	81,82
Gig.marg + N	110,00 ab	0,00 b	272,27	100,00
Gig.marg+ BR4802	261,00 a	122,37 a	472,75	237,27

CV(%)

121,35

264,9

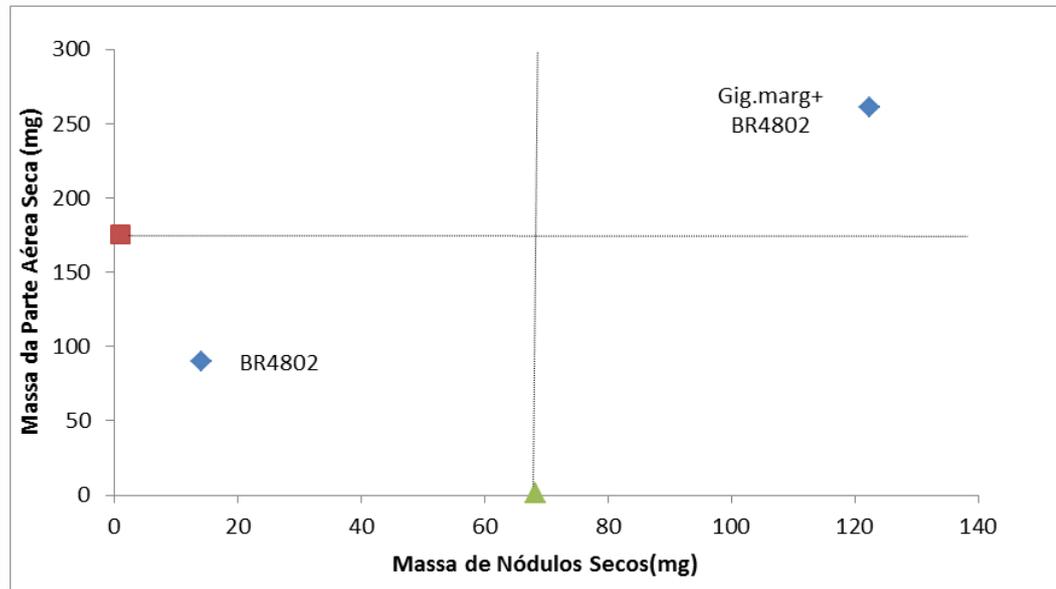


Figura 4. Relação entre a massa dos nódulos secos e a massa da parte aérea seca de plantas de *Piptadenia gonoacantha* do segundo experimento inoculadas com rizóbios e/ou FMAs. O quadrado e o triângulo representam, respectivamente, as médias de todos os tratamentos para as variáveis massa da parte aérea seca e massa dos nódulos secos.

O resultado encontrado nesse experimento foi muito semelhante ao encontrado no experimento anterior. As plantas co-inoculadas com a estirpe BR4802 e *Gigaspora margarita* +BR4802 apresentaram um maior acúmulo de massa nos nódulos, que se refletiu num maior acúmulo de massa seca na parte aérea (Figura 4) e em maior eficiência e eficácia desse tratamento. O tratamento *Gigaspora margarita*+BR4802 apresentou uma atividade aproximadamente dez vezes superior ao tratamento com a estirpe BR4802 (Figura 5).

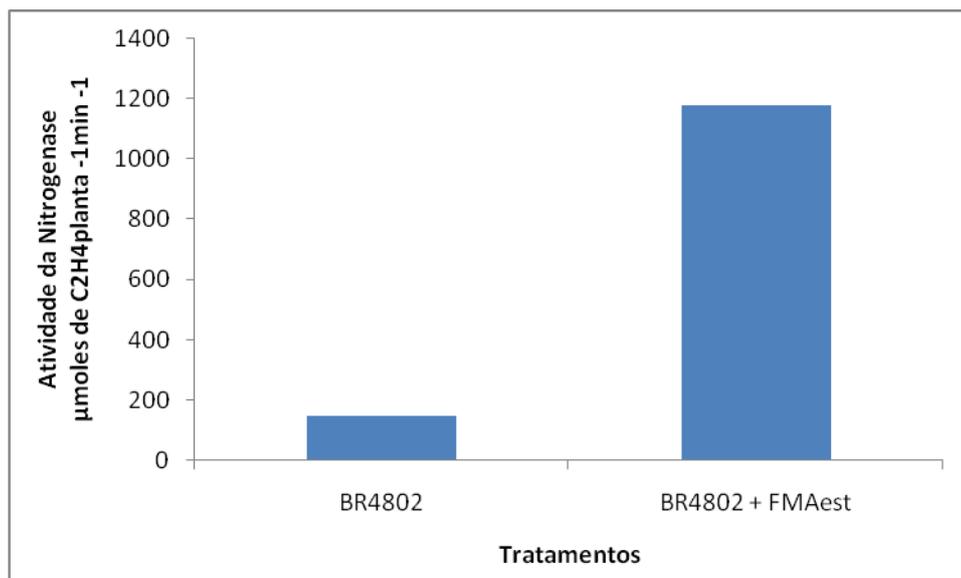


Figura 5. Atividade da Enzima Nitrogenase entre tratamentos sem e com a adição do FMA.

Terceiro experimento com *Piptadenia gonoacantha*

Algumas alterações foram feitas no terceiro experimento devido à falta de resposta à aplicação de N mineral nas plantas sem FMAs e à falta de nodulação com a estirpe BR4812 nos experimentos anteriores. Estes tratamentos foram retirados e a inoculação com a BR4812 foi substituída com a inoculação pela estirpe BSP1. Além disso, ocorreu a adição de novos tratamentos que derivam de tratamentos diferenciados dados ao *Gigaspora margarita*, além da adição de uma nova espécie de fungo *Dentiscutata heterogama* (T.H. Nicolson & Gerd.) (Sieverd et al., 2008).

Observou-se diferença significativa entre os tratamentos ao nível de confiança de 95%, porém a interação entre os fatores estirpe de bactéria e espécie de FMA não foi significativa. Os tratamentos que proporcionaram o maior acúmulo de matéria seca foram aqueles em que as estirpes BSP1 e BR4802 foram co-inoculadas com *D. Heterogama* (Figuras 6 e 7). Estes tratamentos apresentaram, respectivamente, um acúmulo de massa seca 939,33% e 738,58% superior ao da testemunha absoluta, conforme indicado pelos valores de eficiência, e 588,41% e 455,44% superior ao da testemunha inoculada com *D. heterogama* e adubada com N mineral, conforme indicado pelos valores de eficácia (Tabela 5). Os demais tratamentos apresentaram acúmulo de matéria seca significativamente menor e não diferiram entre si ao nível de 5% de probabilidade (Anexo).

Os resultados da análise da relação MSPA/RAIZ variaram entre valores de 0,5 a 2,0. O tratamento com o menor valor da relação foi o de inoculação com *Gigaspora margarita* e aquele com o maior valor foi o de co-inoculação de *Dentiscutata heterogama* e a estirpe BSP1. O tratamento *Dentiscutata heterogama*+BSP1 apresentou uma relação próxima a dois, o que significa que a dupla inoculação promoveu uma alteração em favor de um desenvolvimento maior da parte aérea. Já o tratamento *Dentiscutata heterogama*+BR4802 apresentou uma relação inferior à encontrada na testemunha absoluta, o que indica que esse tratamento promoveu um crescimento radicular maior (Figura 8).

As plantas nodularam com ambas as estirpes e embora a taxa de colonização tenha continuado baixa, esta foi maior que aquelas observadas nos experimentos anteriores. O menor número de nódulos foi observado no tratamento *Dentiscutata heterogama* + BSP1 (Tabela 6). A colonização micorrízica foi observada em 11 dos 15 tratamentos inoculados com FMAs, levando em consideração os tratamentos utilizados como testemunha. O resultado encontrado na avaliação da taxa de colonização acompanhou o desenvolvimento encontrado nos valores de eficiência e eficácia (Tabela 7).

A espécie de fungo *Dentiscutata heterogama* obteve um efeito superior com ambas as estirpes utilizadas, este resultado indica uma maior comparabilidade genética entre os microrganismos (Figura 6). A infecção das raízes por esse fungo também tenderam a ser maiores quando a bactéria estava presente.

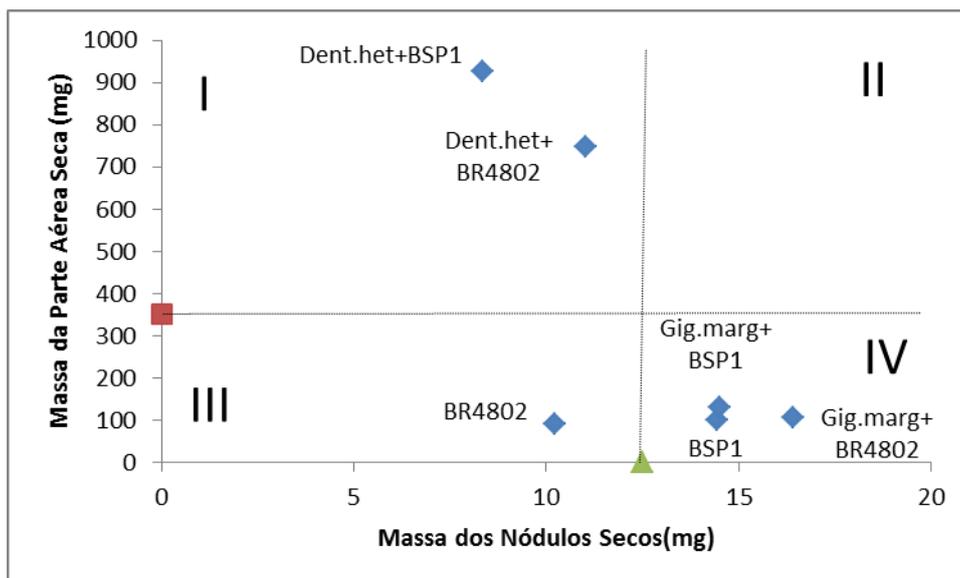


Figura 6. Relação entre a massa dos nódulos secos e a massa da parte aérea seca de plantas de *Piptadenia gonoacantha* do terceiro experimento inoculadas com rizóbios e/ou FMAs. O quadrado e o triângulo representam, respectivamente, as médias de todos os tratamentos para as variáveis massa da parte aérea seca e massa dos nódulos secos.

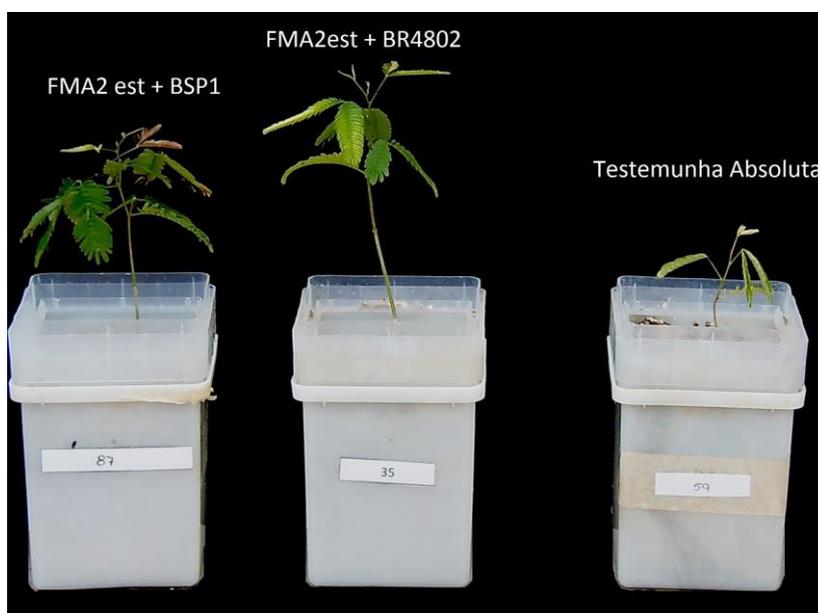


Figura 7. Comparação entre plantas com e sem Fungos micorrízicos

Tabela 3. Influência da dupla inoculação sobre o desenvolvimento de *Piptadenia gonoacantha*. Média de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. A eficácia dos tratamentos inoculados com *G. margarita* e com *D. heterogama* foi calculada com base na testemunha nitrogenada inoculada com cada um desses respectivos fungos.

TRATAMENTOS	MSPA(mg)	MNS(mg)	EFICIÊNCIA(%)¹	EFICÁCIA(%)²
Gig.marg	60,86 c	0,00 c	68,39	45,30*/55,94**
Gig.marg Tratado	69,81 c	0,00 c	78,43	51,95*/64,15**
Dent.het.tratado	76,43 c	0,00 c	85,88	56,88*/70,25**
Dent.het.	82,41 c	0,00 c	92,58	61,32*/75,74**
Gig.mar Mac não-est	88,12 c	0,00 c	98,99	65,57*/80,97**
Testemunha abs	89,11 c	0,00 c	100	66,24*/81,80**
BR4802	92,61 c	10,23 ab	104,04	68,92*/80,97**
BSP1	98,93 c	14,43 ab	111,16	73,63*/120,71**
Gig.marg + BR4802	107,76 c	16,4 a	121,09	80,20*/99,05**
Dent.het + N**	108,81 c	0,00 c	122,25	80,97*/100**
Gig.marg+BSP1	131,33 c	14,51 ab	147,57	97,74*/120,71**
Gig.marg+ N*	134,36 c	0,00 c	150,97	100,00*/123,50**
Dent.het+ BR4802	746,33 b	11,01 ab	838,58	555,44*/685,97**
Dent.het+ BSP1	925,11 a	8,36 b	1039,33	688,41*/850,18**
CV(%)	26,45	49,71		

Tabela 4. Avaliação da Colonização Micorrízica. Média de 2 repetições.

Tratamentos	Taxa de Mic. (%)
<i>Gigaspora margarita</i>	10
<i>Gigaspora margarita</i> + BSP1	11
<i>Gigaspora margarita</i> +BR4802	16
<i>Gigaspora margarita</i> +N	19
<i>Dentiscutata heterogama</i>	12
<i>Dentiscutata heterogama</i> +N	18
<i>Dentiscutata heterogama</i> + BR4802	18
<i>Dentiscutata heterogama</i> + BSP1	25

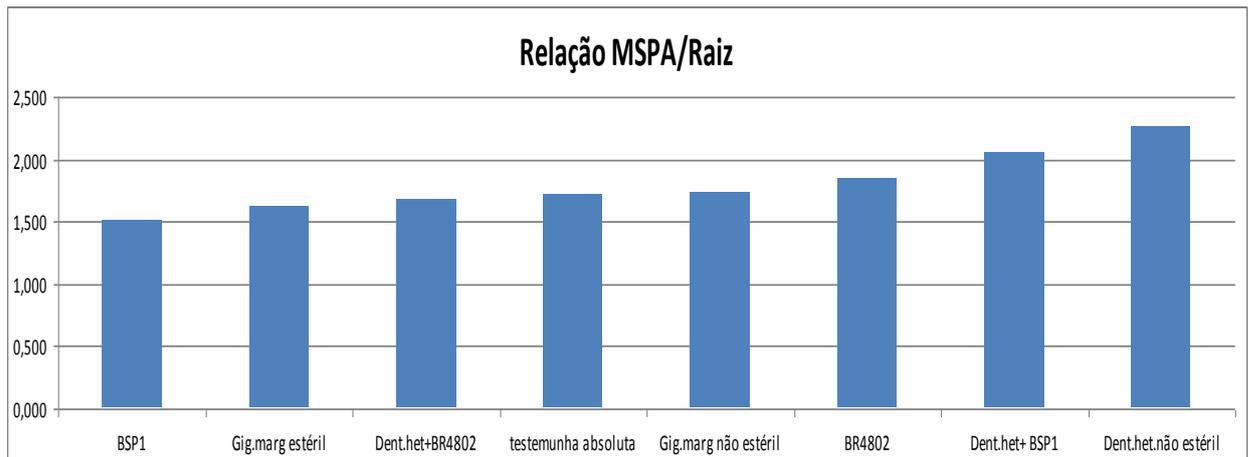


Figura 8. Análise comparativa entre as relações MSPA/RAIZ dos tratamentos. Média de três repetições

A estirpe BR4802 apresenta valores similares em associação com as duas espécies de fungos inoculados. A BR4802 apresentou valores menores de número de nódulos e de massa seca de nódulos quando inoculada sem adição de fungos micorrízicos.

A estirpe BSP1 apresentou um comportamento invertido e variável, onde ela promoveu uma maior nodulação quando inoculada sem a adição do fungo micorrízico. O tratamento *Gigaspora margarita*+ BSP1 promoveu um valor aproximadamente três vezes superior em número de nódulos ao tratamento *Dentiscutata heterogama*+ BSP1 (Tabela 7).

Na análise da nodulação observou se que houve nodulação nos tratamentos dados às espécies de fungo *Gigaspora margarita* e *Dentiscutata heterogama* tratadas (Figura 9).

Tabela 5. Análise da nodulação com adição do fungo micorrízico. Média de três repetições

Tratamentos	Nº Nódulos	MSN(mg)
BR4802	52	9,7
BSP1	99	14,4
<i>Gigaspora margarita</i> + BR4802	73,5	13,85
<i>Gigaspora margarita</i> + BSP1	73	13,1
<i>Dentiscutata heterogama</i> + BR4802	71	14,1
<i>Dentiscutata heterogama</i> + BSP1	23	5,05



Figura 9. Nódulos do Fungo *Gigaspora margarita* tratado.

Experimento com *Mimosa pudica*

Os valores encontrados de MSPA nos tratamentos apresentaram valores significativos apresentados na tabela de Análise de Variância ($p > 0,05$), que indicam a existência de tratamentos significativos (anexo).



Figura 10. Experimento de *Mimosa pudica* na casa de vegetação

Os melhores tratamentos foram a BR3486, *Rhizophagus clarum*+BR3510 e *Dentiscutata heterogama*+BR3486, com resultados de eficiência de 443,59%, 344,29%, 317,48% e 217,48%, 168,80%, 155,66 para eficácia, respectivamente (Tabela 8).

A eficiência da estirpe BR3486 sem adição do FMA promoveu maior ganho de massa seca quando comparada aos tratamentos que receberam essa estirpe com as três diferentes

espécies. Com um ganho aproximadamente 4,5x maior que a testemunha absoluta em massa seca.

A BR3510 apresentou um ganho de massa aproximadamente 2,5X maior que o encontrado na testemunha absoluta sem a co-inoculação de fungos micorrízicos, porém seu melhor resultado foi com a co-inoculação do *Rhizophagus clarum*, apresentando uma eficiência e eficácia de 344,29% e 168,80% respectivamente.

Os controles FMA+N, para as duas espécies de fungos utilizadas, não apresentaram um desenvolvimento significativo, isso permite concluir que a essa dose de 90mg aplicada não foi suficiente para o desenvolvimento da planta.

Tabela 6. Influência da dupla inoculação sobre o desenvolvimento de *Mimosa pudica*. Média de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. A eficácia dos tratamentos inoculados com *G. margarita*, *Rhizophagus clarum* e *D. heterogama* foi calculada com base na testemunha nitrogenada inoculada com cada um desses respectivos fungos.

TRATAMENTOS	MSPA(mg)	MNS(mg)	EFICIÊNCIA(%) ¹	EFICÁCIA(%) ²
Gig.marg Tratado	10,20 b	0,00 c	67,6	39,46*/57,89**/33,14***
Testemunha abs	14,20 b	0,00 c	100	58,37*/69,66**/49,03***
Dent.hetester	15,30 b	0,00 c	106,52	62,18*/85,63**/52,23***
Rhi.cla+N	17,10 b	0,00 c	116,78	68,16*/91,22**/57,26***
Gig.marg+BR3510	21,80 ab	31,10 ab	144,99	84,62*/100**/71,08***
Gig.marg+N*	25,50 ab	0,00 c	171,33	100*/124,15**/84,00***
Rhi.cla+BR3486	28,70 ab	4,30 c	196,97	114,97*/146,7**/96,57***
Dent.het+N	29,50 ab	0,00 c	203,97	119,1*/168,6**/100,00***
Gig.marg não-ester	31,30 ab	0,00 c	215,15	125,6*/174,6**/105,49***
Dent.het+BR3510	34,90 ab	13,70 bc	238,46	139,2*/184,2**/116,91***
BR 3510	38,50 ab	11,10 bc	262,94	153,5*/204,2**/128,91***
Gig.marg+BR3486	38,80 ab	0,00 c	264,1	154,1*/225,2**/129,49***
Rhi.cla não-ester	45,60 ab	0,00 c	312,82	182,6*/226,2**/153,37***
Dent.het+BR3486	45,90 ab	21,10 abc	317,48	185,3*/267,9**/155,66***
Rhi.cla+BR3510	49,60 ab	15,10 bc	344,29	200,9*/271,9**/168,8***
BR3486	63,40 a	37,10 a	443,59	258,9*/379,8**/217,4***
CV(%)	51,47	77,72		

Dentre os treze tratamentos inoculados somente nove apresentaram colonização. (Tabela 9). A colonização foi muito variável entre as espécies de fungos micorrízicos. O fungo que apresentou os menores valores foi o *Gigaspora margarita*. Com o tratamento *Rhizophagus clarum*+BR3510 apresentando o maior valor de colonização. (Tabela 9).

O símbolo quadrado representa a média da variável massa seca dos nódulos, o triângulo representa a média da massa dos nódulos seca. A estirpe BR3486 apesar de promover o maior ganho de massa para a espécie não obteve a maior eficiência na nodulação. O tratamento *Rhizophagus clarum* +BR3510 proporcionou um ganho de massa estatisticamente inferior.

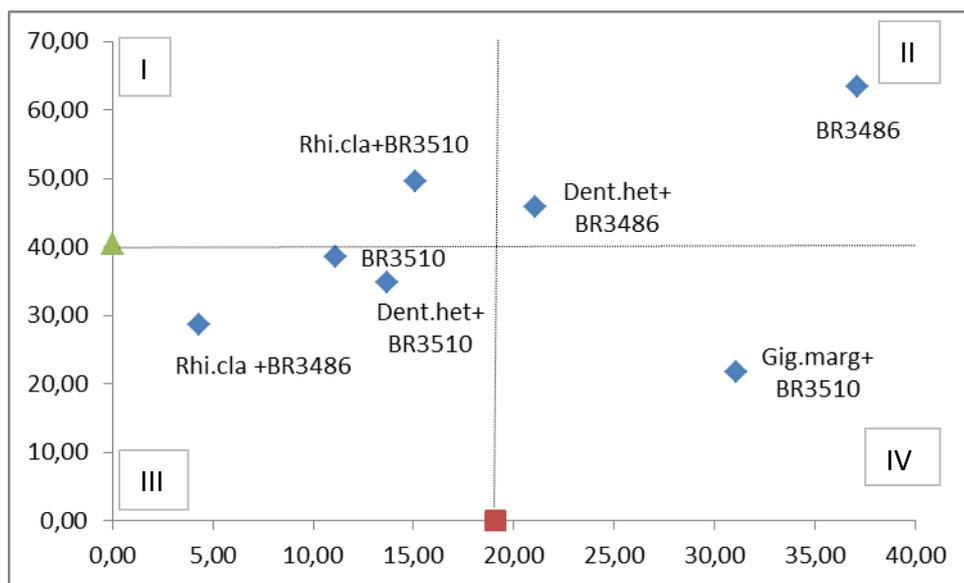


Figura 11. Relação de eficiência MNS x MPAS para a espécie *Mimosa pudica*.

Tabela 7. Avaliação da Colonização Micorrízica. Média de duas repetições

TRATAMENTOS	TAXA DE MICORRIZAÇÃO (%)
<i>Gigaspora margarita</i> Tratado	2
<i>Gigaspora margarita</i> + BR3510	9
<i>Gigaspora margarita</i> + BR3486	9
<i>Gigaspora margarita</i> não esterilizado	17
<i>Rhizophagus clarum</i> + N	14
<i>Rhizophagus clarum</i> + BR3486	15
<i>Rhizophagus clarum</i> + BR3510	51
<i>Dentiscutata heterogama</i> não esterilizado	19
<i>Dentiscutata heterogama</i> + BR3486	20

Em uma análise detalhada das interações (Bactérias x Fungos) como um experimento fatorial não houve nenhuma combinação entre os fungos e as bactérias inoculadas com alguma significância ($p > 0,05$). (anexo)

A análise da relação MSPA/RAIZ retrata que a presença do fungo micorrízico e das estirpes inoculadas sem a adição do fungo induziram a uma alteração na relação.

Esta relação torna possível observar que cada simbiose reagiu de uma forma com a espécie. Os fungos *Rhizophagus clarum* e o *Dentiscutata heterogama* promoveram uma alteração semelhante, causando uma redução na relação, ou seja, aumento o volume do sistema radicular da planta. O tratamento *Rhizophagus clarum* + BR3510 promoveu uma redução nesse volume à metade. (Figura 7)

A planta inoculada com o fungo *Gigaspora margarita* apresentou um comportamento inverso, o tratamento *Gigaspora margarita*+BR3510 promoveu um aumento de 300% (3X) ao volume da parte aérea da planta em relação à testemunha absoluta. Em associação com a estirpe BR3486 o fungo *Gigaspora margarita* promoveu um aumento de 2,5x a parte aérea.

Os tratamentos BR3510 e a BR3486 geraram um ganho no desenvolvimento do sistema radicular acima do encontrado na testemunha absoluta. Gerado pela presença da simbiose.

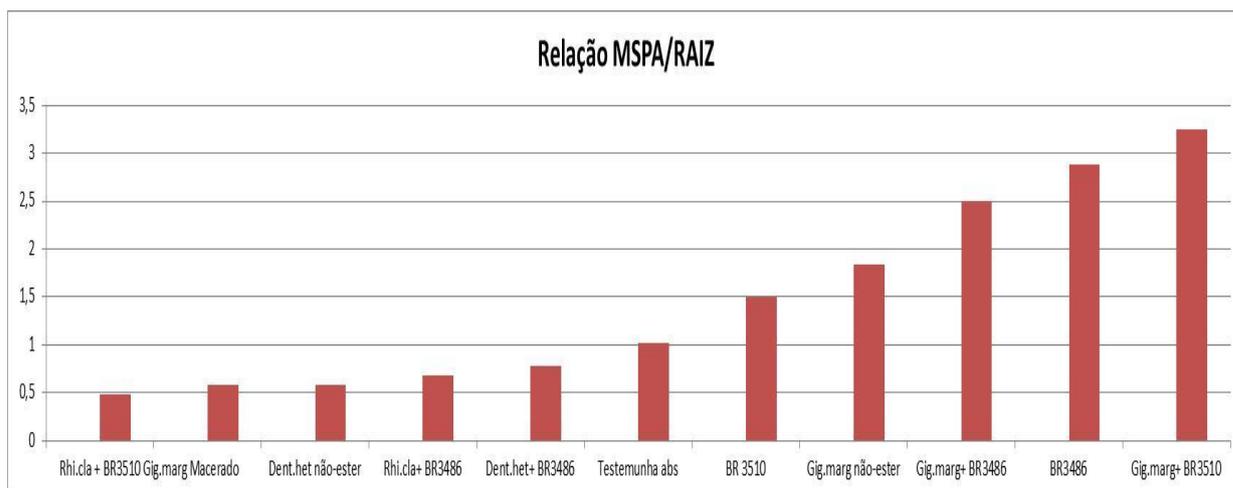


Figura 12. Relação MSPA/RAIZ no desenvolvimento de *Mimosa pudica*. Média de três repetições.

DISCUSSÃO

O presente estudo visou estudar a resposta de *Piptadenia gonoacantha* à inoculação com rizóbios e FMAs, dando continuação a estudos já realizados por JESUS et al. (2005) e BORNAUD (2012). O primeiro estudo realizado com *P. gonoacantha* indicou que esta espécie é altamente dependente de FMAs, inclusive para sua **nodulação**. (JESUS et al., 2005). Contudo, o presente trabalho prova o contrário, já que as plantas nodularam sem a presença do fungo micorrízico. Isto também foi verificado anteriormente por BORNAUD et al. (2005). Embora seja possível que o substrato diferente nos trabalhos citados e no presente trabalho tenham influenciado o resultado (JESUS et al., 2005 utilizaram solo e areia, enquanto, aqui, utilizamos areia e vermiculita), a fonte de fósforo, mais do que o substrato, pode ter sido crucial para os resultados obtidos. Enquanto JESUS et al. (2005) utilizaram uma fonte pouco solúvel, o fosfato de rocha, e em pequena quantidade, aqui se utilizou solução nutritiva com **fósforo prontamente disponível**.

Analisados em conjunto, os resultados desses dois trabalhos indicam que o pau-jacaré é altamente dependente de micorrizas para o seu crescimento, necessitando do FMA quando o fósforo é um fator limitante. Porém, quando o fósforo está prontamente disponível, a planta não depende mais do fungo para crescer e pode nodular sem sua presença. Isso, contudo, não

significa que a co-inoculação não seja importante, pois observações visuais dos nódulos de plantas não inoculadas com FMAs indicam que esses nódulos são amorfos, indicando que a presença do fungo leva a alterações morfológicas nos nódulos. Além disso, dados da literatura mostram que há uma interação positiva entre o fungo e a bactéria, de modo que a bactéria favorece a colonização das raízes de *P. gonoacantha* pelo FMA (BORNAUD, 2012).

Os benefícios da co-inoculação são demonstrados pelo maior acúmulo de matéria seca na parte aérea das plantas micorrizadas e noduladas e pela maior atividade da nitrogenase nas plantas que receberam o FMA. Isto foi evidenciado pela atividade da nitrogenase 10 vezes maior nas plantas co-inoculadas com *G. margarita* e a estirpe de rizóbio BR4802 se comparada à atividade dos nódulos das plantas inoculadas apenas com o rizóbio. Proporcionalmente a massa de nódulos encontrada nesse tratamento também foi aproximadamente dez vezes superior.

Estes resultados ilustram o benefício gerado pela presença do fungo micorrízicos à uma maior fixação biológica de nitrogênio e ao desenvolvimento da planta. Há uma grande exigência do processo de fixação biológica de nitrogênio em energia na forma de ATP, dependendo altamente do fósforo fornecido pelo FMA (Barea e Azcón-Aguilar, 1983; Barea et al., 1992). No trabalho de Pouyu-Rojas et al. (2006), ele ressalta que uma melhor resposta à micorrização se deve à compatibilidade genética entre a espécie de FMA e a espécie de planta, assim como acontece com a relação bactéria leguminosa (Long, 1996).

No caso da *M. pudica*, a co-inoculação não teve efeito aparente, conforme é evidenciado pelo desempenho similar do tratamento de inoculação com a estirpe BR3486 sem a adição de nenhuma espécie de FMA e dos tratamentos de co-inoculação. Isso indica que essa espécie independe do fungo micorrízico para seu melhor desenvolvimento em áreas que não apresentem limitação de fósforo no solo e que o fungo, a princípio, não afeta a nodulação da planta, pelo menos sob as nossas condições experimentais. Outra evidência da independência do FMA para nodulação foi que os nódulos formados pela estirpe BR3486 apresentar a maior massa, o que não aconteceu nos experimentos com a espécie *Piptadenia gonoacantha*. Os resultados dos experimentos com *P.gonoacantha*, conforme já discutido, já mostram um sinergismo, com uma interação positiva entre a bactéria e o fungo. Mesmo na presença do fósforo solúvel, as plantas co-inoculadas acumularam mais matéria seca, como demonstra a alta eficiência desses tratamentos (Tabela 1, 3 e 5).

Os diferentes tratamentos de co-inoculação aplicados à espécie *P. gonoacantha* apresentaram ganho de biomassa na parte aérea que variaram de duas a dez vezes mais que o ganho das testemunhas. Os diferentes resultados encontrados para as diferentes combinações bactéria-FMA indicam que algumas dessas combinações são mais eficientes que outras, sugerindo uma certa especificidade entre os micro-organismos simbiotes. Estes dados corroboram observações de BORNAUD (2012), que observou que a taxa de colonização micorrízica das raízes de *P. gonoacantha* variou em função da estirpe de rizóbio co-inoculada. As diferentes respostas de plantas à inoculação com FMAs podem ser consequência de diferentes estratégias ecológicas dos fungos (colonização, absorção de nutrientes), além da produção de moléculas bioquímicas, que geram uma resposta fisiológica que podem estar propiciando um eventual aumento na colonização (Burleigh, et al., 2002; Burleigh & Bechmann, 2002).

De acordo com os resultados de eficiência e eficácia, a combinação do fungo *Dentiscutata heterogama* com a estirpe BSP1 promoveu um ganho de biomassa na parte aérea aproximadamente 10 x superior, tendo um alto potencial para uma recomendação (Bethlenfalvay et al.,1982). Este resultado corrobora aquele encontrado por Bornaud (2012), que observou que a estirpe BSP1 foi a estirpe que proporcionou o maior crescimento da parte aérea, a maior nodulação e obteve a maior eficiência em plantas de *P. gonoacantha* co-inoculadas. Contudo, esta autora utilizou o fungo *R. clarum*. Pode-se também observar que as plantas inoculadas com a estirpe BSP1 apresentaram uma micorrização das raízes levemente superior àquelas inoculadas com o mesmo fungo, mas com a estirpe BR4802. Isto também corrobora as observações de Bornaud (2012), que observou que a estirpe BSP1 estimulava a colonização das raízes pelo FMA. Aqui, mostra-se que o mesmo efeito observado para *R. clarum* é observado com *D. heterogama*. Entretanto, o desempenho das plantas e os valores de colonização micorrízica foram menores nas plantas inoculadas com *G. margarita*, o que indica que a combinações fungo-bactéria diferentes podem não apresentar efeito positivo no desenvolvimento das plantas de *P. gonoacantha*.

Porém a dupla inoculação não é certeza de um melhor desenvolvimento, como pôde ser observado no presente trabalho. Por exemplo, Patreze et al. (2004) e Carneiro et al. (1998) obtiveram uma colonização baixa para as espécies *A. colubrina* (0 - 14%), *A. falcata* (20% - 49%) e *A. peregrina* (1%-19%). Além de fatores nutricionais, a baixa taxa de infecção pode

estar associada à especificidade entre a planta hospedeira e os FMAs. Um razão para as taxas baixas encontradas de colonização micorrízica no presente trabalho pode ser a quantidade aplicada de fósforo na solução nutritiva (HAYMAN, 1986).

Uma análise dos resultados encontrados na comparação entre as testemunhas nitrogenadas (TN e FMA+TN) indica o quanto à presença do fungo micorrízico é importante para a melhor absorção do nitrogênio adicionado. Esse resultado pôde ser confirmado no segundo experimento, onde o ganho de massa seca na parte aérea das plantas inoculadas com *Gigaspora margarita* foi o dobro daquelas que receberam apenas N. Isso ressalta a dependência micorrízica de *P. gonoacantha* não apenas para a absorção de fósforo, mas também de outros nutrientes (Barea et al., 1987). Estes resultados estão de acordo com o trabalho desenvolvido por Tavasolee et al. (2011) e Chen et al. (2005), que observaram que a colonização de raízes por FMAs aumentou a absorção de fósforo e de nitrogênio da planta.

CONCLUSÕES

1. Não é necessária a presença de fungos micorrízicos para que haja nodulação na espécie *Piptadenia gonoacantha*;
2. As plantas de *Piptadenia gonoacantha* co-inoculadas apresentaram maior biomassa na parte aérea do que aquelas não inoculadas;
3. A combinação *Dentisculata heterogama* com a estirpe BSP1 apresentou-se como altamente promissora para a inoculação de *Piptadenia gonoacantha*;
4. A espécie *Mimosa pudica* não foi dependente do fungo micorrízico para seu desenvolvimento e nodulação nas condições experimentais utilizadas neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd-Alla, M.H., El-Enany, A.H.E., Nafady N.A., Khalaf, D.M., Morsy, F.M.,** Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. Department of Botany and Microbiology, Faculty of Science, Assiut University, Assiut, Egypt .*Microbiological Research* 169 . 49– 58. 2014
- Margulis, L., and M. J. Chapman.** 1998. Endosymbioses: cyclical and permanent in evolution. *Trends Microbiol.* **6**:342–345.
- Futuyma, D. J., and M. Slatkin.** 1983. *Coevolution*, p. 155. Sinauer, Sunderland, Mass.
- Sanders, I. R.** 1999. No sex please, we're fungi. *Nature* **399**:737–739.
- Andrade, G., K. L. Mihara, R. G. Linderman, and G. J. Bethlenfalvay.** 1997. Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* **192**:71–79.
- Allen, O.N., Allen, E.K.** 1981. *The Leguminosae. A Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation.* The University of Wisconsin Press, Madison Wisconsin. 812 pages.
- Bago, B., Pfeffer, P. E., Shachar-Hill, Y.** Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology*, Washington, v.124, n.3, p.949-958, Nov. 2000.
- Barneby, R. C.** 1991. *Sensitivae Censitae: a description of the genus Mimosia* Linnaeus (Mimosaceae) in the New World. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **65**:1-835.
- Becard, G & Piche, Y.** New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist*, v.112, n.1,p.77-83, 1989.
- Bloemberg GV, Wijfjes AHM, Lamers GEM, Stuurman N, Lugtenberg BJJ.** 2000. Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: New perspectives for studying microbial communities. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 1170-1176.
- Boddey RM, Peoples MB, Palmer B, Dart PJ.** 2000. Use of the N-15 natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. *Nutrient Cycling in Agroecosystems.* **57**: 235-270.
- Boddey RM, Urquiaga S, Alves BJR, Reis V.** 2003. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant and Soil* **252**: 139-149.
- Bontemps, C., Elliott, G.N., Simon, M.F., Reis Junior, F.B., Gross, E., Lawton, R.C., Neto, N.E., Loureiro, M.F., de Faria, S.M., Sprent, J.I., James, E.K. and Young P.W.** 2010. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. *Molecular Ecology*, 19-44-52;

Bonfante, P. & Anca, I-A. 2009. Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A network of interactions. *Annual Rev. of Microbiology*. 63:363-83

Bonfante P, Balestrini R, Mendgen K. Storage and secretion processes in the spore of *Gigaspora margarita* Becker & Hall as revealed by high-pressure freezing and freeze substitution. *New Phytol* 128: 93–101. 1994.

Brundrett, M. C. Mycorrhizas in natural ecosystems. *Advances in Ecological Research*. London, v.21, p.171-213, 1991.

Burleigh, S. H.; Bechmann, I. E. Plant nutrient transporter regulation in arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil*, v. 244, p. 247-251, 2002.

Burleigh, S. H.; Cavagnaro, T.; Jakobsen, I. Functional diversity of arbuscular mycorrhizas extends to the expression of plant genes involved in P nutrition. *Journal of Experimental Botany*, v. 53, p. 1593-1601, 2002.

Bethlenfalvay, J.G., Pacovsky, J.G., Bayne, G.H., Stafford, A.E. Interactions between Nitrogen Fixation, Mycorrhizal Colonization, and Host-Plant Growth in the Phaseolus-Rhizobium- Glomus Symbiosis. *Plant Physiology*. V.70, 446-450.1982

Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. *Biology of microorganisms*. 7th ed. New Jersey. Prentice Hall, 1994. 909p.

Broughton, W.J., Hanin, M., Relic, B., Kopcinska, J., Golinowski, W., Simsek, S., Ojanen-Reuhs, B., Marie, C., Kobayashi, H., Bordogna, B., Le Quere, A., Jabbouri, S., Fellay, R., Perret, X., Deakin, W.J. Flavonoid-inducible modifications to rhamnan O antigens are necessary for *Rhizobium* sp. strain NGR234-legume symbioses. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.188, n.10, p.3654-3663, may 2006.

Caldeira, M.V.W., Silva E. M. R., Franco, A.A., Zanon, M.L.B. Crescimento de Leguminosas arbóreas em respostas a inoculação com Fungos Micorrízicos Arbusculares. *Ciência Florestal*, v.7, n.1, 1997

Carneiro, M. A. C. et al. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas e arbustivas nativas de ocorrência no sudeste do Brasil. *Cerne*, v.4, n.1, p.129-145, 1998.

Chen, W. M., S. Laevens, T. M. Lee, T. Coenye, P. de Vos, M. Mergeay, P. Vandamme. 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:1729-1735.

Chen, W. M., E. K. James, A. R. Prescott, M. Kierans, J. I. Sprent. 2003a. Nodulation of *Mimosa* spp. by the β -proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 1051-1061.

Chen, W. M., L. Moulin, C. Bontemps, P. Vandamme, G. Béna, C. Boivin-Masson. 2003b. Legume symbiotic nitrogen fixation by β -Proteobacteria is widespread in nature. *Journal of Bacteriology* 185: 7266-7272.

Chen, W-M, James E.K., Coenye, T. 2006. *Burkholderia mimosarum* sp. Nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. From Tiawan and South-America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1847-1851

Chen, W-M, de Faria, S.M., Chou J-H. 2008 *Burkholderia sabie* sp. Nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58, 2174-2179

Chen X, Tang JJ, Zhi GY, Hu SJ. Arbuscular mycorrhizal colonization and phosphorus acquisition of plants: effects of coexisting plant species. *Appl Soil Ecol* 28:259–269. 2005

Cleveland CC, Townsend AR, Schimel DS, Fisher H, Howarth RW, Hedin LO, Perakis SS, Latty EF, Von Fischer JC, Elseroad A, Wasson MF. 1999. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles* 13: 623-645.

Coenye T, Vandamme P. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches *Environmental Microbiology* 5: 719-729.

Cranenbrouck s., Voets l., Bivort C., Renard l., Strullu D-S., Declerck S.2005. Methodologies for in vitro cultivation of arbucualr mycorrhizal fungi with root organs. **In: Vitro Culture of Mycorrhizas Series: Soil Biology**, Vol. 4 Declerck, Stéphane; Strullu, Désiré-Georges; Fortin, J. André (Eds.), XXIV, p.341-375.

Dalmastri C, Fiore A, Alisi C, Bevivino A, Tabacchioni S, Giuliano G, Sprocati AR, Segre L, Mahenthalingam E, Chiarini L, Vandamme P. 2003. A rhizospheric *Burkholderia cepacia* complex population: genotypic and phenotypic diversity of *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia ambifaria*. *FEMS Microbiology Ecology* 46: 179-187.

Engelhard, M., Hurek, T., Reinhold-Hurek, B. 2000. Preferential occurrence of diazotrophic endophyte, *Azoarcus* sp. in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. *Environmental Microbiology* 2: 131-141.

Estrada de Los Santos, P., R. Bustillos-Cristales, J. Caballero-Mellado. 2001. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2790-2798.

Declerck, S., Strullu D.G. & Fortin J.A. 2005 **In: Vitro Culture of Mycorrhizas Series: Soil Biology**, Vol. 4 Declerck, Stéphane; Strullu, Désiré-Georges; Fortin, J. André (Eds.) 2005, XXIV, pp.388.

de Faria, S.M. de, Mc Inroy, S.G and Sprent, J.I.1987. Occurrence of infected cells, with persistent infection threads, in legume root nodules. *Canadian Journal of Botany*; 65:553-558

de Faria, S.M. de, Lima, H.C., Mucci, E.S.F and Sprent, J.I. 1987. Nodulation of legume trees from south east Brazil.. *Plant and Soil*, 99: 347-356

de Faria, S.M., Lewis, G.P., Sprent, J.I., & Suherland, J.M.1989. Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New Phytologist*, 111:185-192

- de Faria, S.M. Lima, H.C., Olivares, F.L., Melo, R.B. & Xavier, R.P.** 1999. Nodulação em espécies florestais, especificidade hospedeira e implicações na sistemática de leguminosae. *Soil Fertility, Soil Biology, and Plant Nutrition Interrelationships*. 667-686
- de Faria, S. M., H. C. de Lima, A. A. Franco, E. S. F. Mucci, J. I. Sprent.** 1987. Nodulation of legume trees from South East Brazil. *Plant and Soil* 99: 347-356.
- de Faria, S. M., G.T. Hay, J. I. Sprent.** 1988. Entry of rhizobia into roots of *Mimosa scabrella* Bentham occurs between epidermal cells. *Journal of General Microbiology* 134: 2291-2296.
- de Faria, S. M., H. C. de Lima.** 1998. Additional studies of the nodulation status of legume species in Brazil. *Plant and Soil* 200: 185-192.
- de Faria, S. M.,Diedhiou, A.G., Lima H.C.de, Ribeiro, R.D., Galiana, A. Castilho, A.F. and Henriques, J.C.** 2010 Evaluation the nodulation status of leguminous species from the Amazonian forest of Brazil. *Journal Experimental Botany* 62 (11):3119-3127.
- de Souza F A & Declerck S** 2003. Mycelium development and architecture, and spore production of *Scutellospora reticulata* in monoxenic culture with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycologia*, v.95, n.6,p.1004-1012.
- de Souza & Berbara** 1999. Ontogeny of *Glomus clarum* in Ri T-DNA transformed roots. *Mycologia*, v.91, n.2,p.343-350, 1999.
- Eom, A.H.; Hartnett, D.C.; Wilson, G.W.T.** Host plant species effects on arbuscular mycorrhizal fungal communities in tallgrass prairie. *Oecologia*, 122:435-444,2000.
- Flores-Aylas, W. W.; Saggin-Júnior, O. J.; Siqueira, J. O.; David, A. C.** Efeito de *Glomus etunicatum* e fósforo no crescimento inicial de espécies arbóreas em semeadura direta. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.38, n.2, p.257-266, fev. 2003
- Fortin J.A.; Declerck, S. & Strullu D.G.** 2005 *In vitro* culture of mycorrhizas – Part 1 State of Art. **In: Vitro Culture of Mycorrhizas Series: Soil Biology**, Vol. 4 Declerck, Stéphane; Strullu, Désiré-Georges; Fortin, J. André (Eds.), XXIV, p. 3-16.
- Fougnies, L. et al.** Arbuscular Mycorrhizal Colonization and nodulation improve flooding tolerance in *Pterocarpus Officinalis* Jacq. Seedlings. *Mychorriza*. Berlin. V.7. n.1, p. 159-166, Feb.2006.
- Franco, A. A., de Faria S. M.** 1997. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biology Biochemistry* 29: 897-903.
- Frey-Klett P, Garbaye J, Tarkka M.** The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol* 176: 22–36. 2007
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P. and Barker, D.G.** 2005. Arbuscular Mycorrhizal Fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant and Cell* 17:3489-3499.

- Gillis M, Van Tran V, Bardin R, Goor M, Hebbar P, Willems A, Segers P, Kersters K, Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D.** 2007. Legumes symbioses : absence of nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science*, 316:1307-1312
- Gonçalves, C.A., Goi, S.R., Neto, J.J.** Crescimento e Nodulação de *Inga marginata* em resposta à adição de nitrogênio, fósforo e inoculação com rizóbio. *Floresta e Ambiente*. v. 6, n.1, p.118 - 126, jan./dez. 1999
- Heulin T, Fernandez MP.** 1995. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 45: 274-289.
- Hirsch, A.M., Kapulnik, Y.** Signal transduction pathways in mycorrhizal associations: Comparisons with the Rhizobium- Legume Symbiosis. *Fungal Gen and Biol* 23:205–212. 1998.
- Giovannetti, M. & Mosse, B.** 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 84: 489-500. 1980.
- Gyaneshwar, P., James, E.K., Reddy, P.M., Ladha, J.K.** 2002. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium tolerant rice varieties. *New Phytologist* 154: 131-146.
- Haukka K, Lindstrom K, Young JPW.** 1998. Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 419-426.
- Högburg, P.,** 1997. ¹⁵N natural abundance in soil-plant systems. *New Phytologist* 137: 179-203.
- Iwamoto T, Tani K, Nakamura K, Suzuki Y, Kitagawa M, Eguchi M, Nasu M.** 2000. Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. *FEMS Microbiology Ecology* 32: 129-141.
- Jesus, E. da C., Schiavo, J. A. e de Faria, S. M.** 2005. Dependência de micorrizas para a nodulação de leguminosas arbóreas tropicais. *Rev. Árvore*, 29 (4):545-552.
- Khan IA, Ayub N, Mirza SN, Nizami SM, Azam M.** Synergistic effect of dual inoculation (vesicular-arbuscular mycorrhizae) on the growth and nutrients uptake of *Medicago sativa*. *Pak J Bot* 40:939–945. 2008
- Kistner, C. Parniske, M.** 2002. Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends in Plant Science*, 7(11):511-518
- Lavin M, Pennington RT, Klitgaard BB, Sprent JI, de Lima HC, Gasson PE.** 2001. The dalbergioid legumes (Fabaceae): Delimitation of a pantropical monophyletic clade. *American Journal of Botany* 88: 503-533.
- Lewis, G.P.** 1987. *Legumes of Bahia*. Kew, Royal Botanic Gardens.

Lewis, G.P., Schrire, Mackinder, B. and Lock, M. 2005. Legumes of the world. The Royal Botanic Gardens Kew

Limpens E, Franken C, Smit P, Willemse J, Bisseling T, Geurts R. 2003. *LysM* domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* 302: 630-633.

Lovell CR, Piceno YM, Quattro JM, Bagwell CE. 2000. Molecular analysis of diazotroph diversity in the rhizosphere of the smooth cordgrass, *Spartina alterniflora*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3814-22.

Lodwig, E.M., Hosie, A.H.F., Bourdes, A., Findlay, K., Allaway, D., Karunakaran R. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-Rhizobium symbiosis. *Nature*. 422:722–6. 2003

Marin, V. A.; Baldani, V. L. D.; Teixeira, K. R. S.; Baldani, J. I. Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical. Disponível em: <<http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc091.pdf>> Acesso em: 15 de junho de 2007.

Markmann, K. & Parniske, M. 2009. Evolution of root endosymbiosis with bacteria: how novel are nodules? *Cell* 14(2):77-86

Mello, A.H., Silva, E.M.R., Saggin Júnior, O.J. 2012. Dependência Micorrízica Da Leguminosa *Mimosa artemisiana* Heringer & Paula. *Agroecossistemas*. v. 4, n. 2, p. 67-78, 2012.

Mia MAB, Shamsuddin ZH. 2010. Rhizobium as a crop enhancer and biofertilizer for increased cereal production. *Afr J Biotechnol* 9:6001–6009

Miller, R. M.; Reinhardt, D. R.; Jastrow, J. D. External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. *Oecologia*, Berlin, v.103, n.1, p.17–23, July 1995.

Moreira, F. M. S., M. Gillis, B. Pot, K. Kersters, A. A. Franco. 1993. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Systematic and Applied Microbiology* 16: 135-146.

Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Lavras: Editora UFLA, 2 ed, 2006.

Moulin, L., A. Munive, B. Dreyfus, C. Boivin-Masson. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature* 411:948-950. 2001.

Moulin, L., Chen, W-M., Béna, G., Dreyfus, B., Boivin-Masson, C. Rhizobia: the family is expanding. Pages 61-65 in: *Nitrogen Fixation: Global Perspectives*. T. Finan, M. O’Brian, D. Layzell, K. Vessey, and W. Newton, eds. CAB International. 2002.

Oyaizu, H., S. Matsumoto, K. Minamisawa, T. Gamou. Distribution of rhizobia in leguminous plants surveyed by phylogenetic identification. *Journal of General and Applied Microbiology* 39: 339-354. 1993.

Palmer, K.M., Turner, S.L., Young, J.P.W. Sequence Diversity of the Plasmid Replication Gene *repC* in the *Rhizobiaceae*. *Plasmid* 44: 209-219. 2000.

Parniske, M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol.* 6(10):763-75. Review. 2008

Pouyu-Rojas, E.; Siqueira, J.O. & Santos, J.G.D. Compatibilidade simbiótica de fungos micorrízicos arbusculares com mudas de espécies arbóreas tropicais. *R. Bras. Ci. Solo*, 30:413-424, 2006.

Rodriguez, A.; Clapp, J. P.; Dodd, J. C. Ribosomal RNA gene sequence diversity in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *The Journal of Ecology*, Oxford, v.92, n.6, p.986-989, Dec. 2004.

Redecker D., Hijri,M., Dulieu,H. & Sanders,I.R. (1999). Phylogenetic analysis of a dataset of fungal 5.8S rDNA sequences shows that highly divergent copies of internal transcribed spacers reported from *Scutellospora castanea* are of ascomycete origin. *Fungal Genetics and Biology* 28(3):238-244.

Rigottier-Gois L, Turner SL, Young JPW, Amarger N. 1998. Distribution of *repC* plasmid-replication sequences among plasmids and isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* from field populations. *Microbiology* 144: 771-780.

Rivas R, Velazquez E, Willems A, Vizcaino N, Subba-Rao NS, Mateos PF, Gillis M, Dazzo FB, Martinez-Molina E. 2002. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5217-5222.

Scannerini, S., Bonfante, P. Bacteria and bacteriallike objects in endomycorrhizal fungi. In: Margulis L, Fester R (eds) *Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis*. MIT Press: Cambridge, pp 273–287. 1991.

Sieverding,E.1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. *Eschborn: GTZ*,. 371 p.

Somasegaran, P., Hoben, H.J. 1994. *Handbook for rhizobia: methods in Legume-rhizobium technology*. Springer-Verlag, New York.

Smith, S E & Read, D J. *Mycorrhizal symbiosis*. London, UK: Academic Press, 1997.

Sprent, J.I., Geoghegan, I.E., Whitty, P.W., James, E.K. 1996. Natural abundance of ¹⁵N and ¹³C in nodulated legumes and other plants in the Cerrado and neighbouring regions of Brazil. *Oecologia* 105: 440-446.

Sprent JI, Parsons R. 2000. Nitrogen fixation in legume and non-legume trees. *Field Crops Research* 65: 183-196.

- Sprent.** 2001. Flooding-tolerant legume symbioses from the Brazilian Pantanal. *New Phytologist* **150**:723-738.
- Sprent, J. I.** 2001. Nodulation in legumes. Royal Botanic Gardens, Kew, London.
- Sprent, J. I.** 2009. Legume nodulation: A Global Perspective. Wiley-Blackwell
- Swedlow JR, Hu K, Andrews PD, Roos DS, Murray JM.** 2002. Measuring tubulin content in *Toxoplasma gondii*: A comparison of laser-scanning confocal and wide-field fluorescence microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 2014-2019.
- Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., de Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M.,**
- Gillis, M., Boivin-Masson, C., Dreyfus, B.** 2001a. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *Journal of Bacteriology* **183**: 214-220.
- Tavasolee A, Aliasgharzad N, Jouzani GS, Mardi M, Asgharzadeh A.** 2011. Interactive effects of arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobial strains on chickpea growth and nutrient content in plant. *Afr J Biotechnol* **10**:7585–7591
- Tirlapur UK, Konig K.** 1999. Near-infrared femtosecond laser pulses as a novel non-invasive means for dye-permeation and 3D imaging of localised dye-coupling in the *Arabidopsis* root meristem. *Plant Journal* **20**: 363-370.
- Trinick, M. J.** 1980. Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. *J. Appl. Bacteriol.* **49**:39-53.
- Turner SL, RigottierGois L, Power RS, Amarger N, Young JPW.** 1996. Diversity of *repC* plasmid-replication sequences in *Rhizobium leguminosarum* *Microbiology* **142**: 1705-1713.
- Turner SL, Knight KAL, Young JPW.** 2002. Identification and analysis of rhizobial plasmid origins of transfer. *FEMS Microbiology Ecology* **42**: 227-234.
- van Berkum, P., Eardly, B.D.** 1998. Molecular evolutionary systematics of the Rhizobiaceae. In: Spaink et al. (eds) *Rhizobiaceae – Molecular Biology of the Model Plant-Associated Bacteria*. Pp. 1-24. Kluwer, Dordrecht.
- van Berkum, P., Eardly, B.D.** 2002. The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1132-1136.
- van der Heijden, M G A; Klironomos, J N; Ursic, M; Moutoglis, P; Streitwolf, E R; Boller, T; Wiemken, A; Sanders, I R.** Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature London*, v.396, n.6706,p.69-72, 1998.

- Vandamme, P., J. Goris, W. M. Chen, P. de Vos, A. Willems.** 2002. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Systematic and Applied Microbiology* **25**:507-512.
- Vandenkoornhuysen P, Ridgway KP, Watson IJ, Fitter AH, Young JPW.** 2003. Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology* **12**: 3085-3095.
- Verma, S. C., S. P. Chowdhury, A. K. Tripathi.** 2004. Phylogeny based on 16S rDNA and *nifH* sequences of *Ralstonia taiwanensis* strains isolated from nitrogen-fixing nodules of *Mimosa pudica*, in India. *Canadian Journal of Microbiology* **50**: 313-322.
- Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ, Lupski JR.** 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cell Biology* **5**: 25-40.
- Vincent, J. M.** 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. *IBP handbook* 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Wang, E.T., Rogel, M.A., de los Santos, A.G., Martínez-Romero, J., Cevallos, M.A., Martínez-Romero, E.** 1999. *Rhizobium etli* bv. *Mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **49**: 1479-1491.
- Wang X, Pan Q, Chen F, Yan X, Liao H.** Effects of coinoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on soybean growth as related to root architecture and availability of N and P. *Mycorrhiza*.**21**:173–81. 2011
- Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M.** 1992. Proposal of *Burkholderia* gen-nov and transfer of 7 species of the genus *Pseudomonas* homology group-II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb-nov. *Microbiology and Immunology* **36**: 1251-1275.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H. and Nishiuchi, Y.** 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) cob. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* **39**: 897-904.
- Young JPW.** 1992. In: *Biological Nitrogen Fixation*. (Eds: Stacey, G., Burris, R. H., Evans, H. J.). New York, Chapman and Hall
- Young JPW.** 1996. Phylogeny and taxonomy of rhizobia. *Plant and Soil* **186**: 45-52.
- Young, J.P.W.** 2004. In: *Nitrogen fixation: 1888-2001. VI. Genomes and genomics of nitrogen-fixing organisms*. (Eds: R. Palacios and W. E. Newton), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Wojciechowski, M. F., M. Lavin, and M. J. Sanderson.** 2004. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany* **91**: 1846-1862

ANEXO

Análise de Variância experimento 1

Análise de Variância do experimento do *Piptadenia gonoacantha* para Massa Seca da Parte Aérea.

Experimento número 1. média de três repetições

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTOS	7	5,060841	0,722977	0,475	0,8388
RESÍDUOS	16	24,351037	1,52194		
TOTAL	23	29,411879			
CV(%)	28,34				

Análise de Variância do experimento do *Piptadenia gonoacantha* para Massa Seca da Parte Aérea.

Experimento número 2 . média de três repetições

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO					
S	10	0,033735	0,003373	2,852	0,0118
RESÍDUOS	32	0,037851	0,001183		
TOTAL	42	0,071586			
CV(%)	3,34				

Análise de Variância experimento 3

Análise de Variância do experimento de *Piptadenia gonoacantha* para Massa Seca da Parte Aérea.

Experimento número 3. média de três repetições

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTOS	17	0,5373	0,031609	74,292	0,000
RESÍDUOS	36	0,015317	0,000425		
TOTAL	53				
CV(%)	1,92				

Análise de Variância das interações Bactéria x FMA. Experimento número 3. média de três repetições

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BACTÉRIAS	2	0,001989	0,000995	2,257	0,1335
FUNGOS	2	0,000385	0,000193	0,437	0,6527
BACTÉRIAS*FUNGO					
S	4	0,0011	0,000275	0,624	0,6515
RESÍDUOS	18	0,007934	0,000441		
TOTAL	28	0,011409			
CV(%)	2,01				

Análise de Variância experimento 4

Análise de Variância do experimento de *Mimosa pudica* para Massa Seca da Parte Aérea. média de três repetições

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	16	0,002592	0,000162	2,731	0,0068
Resíduos	34	0,002017	0,000059		
Total	50	0,00461			

CV(%) 0,76

Análise de variância das interações Bactéria x FMA. Experimento 4. média de três repetições

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bactérias	2	0,000278	0,000139	1,731	0,1987
Fungo	3	0,000181	0,000061	0,745	0,5359
Bactérias*Fungos	6	0,001208	0,000201	2,506	0,0501
Resíduos	24	0,001929	0,000081		
Total	35	0,003594			
CV(%)	0,88				

Solução Nutritiva

	PM	Solução Final (mM)	Solução estoque (g/l)	ml de Solução estoque/l de solução final
Macro nutrientes				
KH ₂ PO ₄	136,09	0,1	13,609	1
KCl	74,55	3	223,65	1
CaCl ₂ ,(H ₂ O) ₂	147,02	2	294,04	1
MgSO ₄ ,(H ₂ O) ₇	246,48	1	246,48	1
Micro nutrientes				
		μM		
H ₃ BO ₃	61,8	4	6,25	0,2ml/ 5l (0,04 ml/l)
MnSO ₄ , H ₂ O	169	6	25	
ZnSO ₄ , (H ₂ O) ₇	287,54	0,9	6,25	
CuSO ₄ , (H ₂ O) ₅	249,68	1	6,25	
Na ₂ MoO ₄ , (H ₂ O) ₂	241,95	0,1	0,625	
Ferro EDTA			16,6	

Tabela 5. Contagem de células.

Bactérias	Diluições												
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷		
					RI	RII	RIII	RI	RII	RIII	RI	RII	RIII
3486	INCONTÁVEL	INCONTÁVEL	INCONTÁVEL	INCONTÁVEL	47	40	52	10	11	9	2	2	0
P1	INCONTÁVEL	INCONTÁVEL	INCONTÁVEL	INCONTÁVEL	53	51	68	11	10	11	5	7	0
3510	INCONTÁVEL	INCONTÁVEL	INCONTÁVEL	INCONTÁVEL	52	46	56	9	9	10	2	4	0
4812	INCONTÁVEL	INCONTÁVEL	INCONTÁVEL	INCONTÁVEL	54	53	61	8	8	7	3	5	0
4802	INCONTÁVEL	INCONTÁVEL	INCONTÁVEL	INCONTÁVEL	57	46	52	10	6	8	2	3	0
