

EMMANUELLA VILA NOVA DA SILVA

**INTERRELAÇÃO BACTÉRIAS (MHB) E FMA: ESTRATÉGIA PARA
ESTIMULAR A EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA E MICORRIZAÇÃO DE SABIÁ**

**RECIFE – PE
MARÇO DE 2012**

EMMANUELLA VILA NOVA DA SILVA

**INTERRELAÇÃO BACTÉRIAS (MHB) E FMA: ESTRATÉGIA PARA
ESTIMULAR A EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA E MICORRIZAÇÃO DE SABIÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Ciências do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências do Solo.

Orientadora: Dra. Márcia do Vale Barreto Figueiredo

Co-orientadores: Dra. Adália Cavalcanti do E. Santo Mergulhão

Dra. Cláudia Elizabete Pereira de Lima

**RECIFE – PE
MARÇO DE 2012**

Ficha Catalográfica

S586i Silva, Emmanuella Vila Nova da
Interrelação bactérias (MHB) e FMA: estratégia para estimular
a eficiência simbiótica e micorrização de sabiá / Emmanuella Vila
Nova da Silva. -- Recife, 2012.
87 f.: il.

Orientador (a): Márcia do Vale Barreto Figueiredo.
Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia,
Recife, 2012.

Inclui referências e apêndice.

1. Química do solo 2. Microbiologia do solo 3. Fertilidade do
solo 4. Fixação biológica de nitrogênio 5. Mycorrhiza helper
bacteria 6. *Mimosa caesalpinifolia* 7. Sinergismo 8. Simbiose
9. Colonização radicular I. Figueiredo, Márcia do Vale Barreto,
Orientadora II. Título


CDD 631.4

**INTERRELAÇÃO BACTÉRIAS (MHB) E FMA: ESTRATÉGIA PARA
ESTIMULAR A EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA E MICORRIZAÇÃO DE SABIÁ**

EMMANUELLA VILA NOVA DA SILVA


Dissertação defendida e aprovada em 07 de março de 2012.

ORIENTADORA:




Dr. Márcia do Vale Barreto Figueiredo
Instituto Agrônômico de Pernambuco – IPA/SEAGRI

EXAMINADORES:



Dr. José de Paula Oliveira
Instituto Agrônômico de Pernambuco – IPA



Dr. Claudia Elizabete Pereira de Lima
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE



Dr. Carolina Etienne de Rosário e Silva Santos
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

OFEREÇO

A minha querida mãe Célia (*in memorian*) por todo amor, carinho e dedicação. Um exemplo de mãe e mulher!

A minha irmã Rafaella pelo amor, apoio e incentivo sempre dedicado.

Aos meus avôs João e Aldemir (*in memorian*) e minhas avós Inácia e Creuza, aos meus tios Mário, Alcélia e Márcia, aos meus primos Mário e Marcela, por todo incentivo e torcida.

DEDICO

Ao meu grande amor Wagner Oliveira pelo companheirismo, pela dedicação, pelo amor, pelos conselhos e por toda a paciência. Você foi meu braço direito!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, acima de qualquer coisa, por me manter firme nas dificuldades, dando-me o conforto e a sabedoria para enfrentar meus obstáculos.

A minha querida mãe Célia Vila Nova da Silva, *in memoriam*, que me deu toda base de ensinamentos. E a minha irmã Rafaella Vila Nova da Silva, que sempre me incentivou e me deu forças para concluir meus estudos.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), ao Programa de Pós-graduação em Ciências do Solo pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

A FACEPE e a CAPES pelo apoio financeiro durante o curso.

A minha querida orientadora, Dra. Márcia do Vale Barreto Figueiredo, pelos conselhos e pelas palavras de conforto, nos momentos mais difíceis e delicados desta caminhada. Pelo apoio incondicional nos momentos decisivos.

As minhas co-orientadoras, Dra. Adália Cavalcanti do Espírito Santo Mergulhão e Dra. Cláudia Elizabete Pereira de Lima, pela amizade, pelas dúvidas tiradas, pelo carinho e pela atenção a mim dedicada.

Aos Professores do Programa, Clístenes Nascimento, Maria Betânia Freire, Mário Lira Jr., Newton Stamford, Ângelo Alves, Valdomiro de Souza Júnior, Brivaldo Almeida pelos ensinamentos transmitidos.

Aos pesquisadores do IPA: Dra. Maria do Carmo dos Santos, Dra. Sônia Formiga, Dra. Luiza Bastos, Dra. Maria do Carmo Catanho (Cacau), Dr. Roberto Gomes e em especial ao responsável técnico do laboratório, Dr. José de Paula Oliveira, pelos excelentes conselhos científicos e por nunca terem medido esforços para ajudar que este trabalho fosse realizado.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA, onde pude por em prática os ensinamentos teóricos recebidos, propiciando-me experiências na área profissional.

A Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) - Laboratório de Micorriza pelo suporte técnico, e em especial a Vilma dos Santos pela ajuda prestada.

A minha família, pelo total apoio que recebi durante o curso. Pela educação, amor e credibilidade que sempre me proporcionaram.

A Maria Vanilda Santana, amiga e companheira de trabalho, mesmo tendo chegado na etapa final do trabalho, você foi fundamental!

Aos meus amigos e amigas do Laboratório de Biologia de Solo: Maria do Carmo Barreto (Hélia), Aníbia Vicente, Tailton Severino, Marília Malta, Jadson Antunes, Rogério Portela, Arthur Lira, Carolina Kropniczki, Artenisa Cerqueira, Mário Leandro, Fábio César, Marta Amâncio, pelo convívio, carinho e apoio prestado.

A todos os meus colegas de Tuma pelos bons momentos de estudo e descontração. Em especial a Danúbia, Rosângela, Monalisa, Vanessa, Marilúcia, Airon e Renato.

Aos funcionários da UFRPE Maria do Socorro, Eliane, Josué pela atenção e ajuda indispensável.

As minhas amigas da graduação Alexandra de Andrade, Patrícia Karla, Priscila Pessoa e Suzana Oliveira.

Enfim, a todos envolvidos direta e indiretamente neste trabalho, obrigada!

O fator decisivo para vencer o maior obstáculo é, invariavelmente, ultrapassar o obstáculo anterior.

Henry Ford

SUMÁRIO.....	Pág.
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO GERAL.....	xiii
GENERAL ABSTRACT.....	xv
INTRODUÇÃO GERAL.....	17
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
Fixação Simbiótica de Nitrogênio.....	19
Fungos Micorrízicos Arbusculares – FMA.....	20
Mycorrhiza Helper Bacteria – MHB.....	22
Sabiá (<i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth).....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
CAPÍTULO I. ATIVIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM LUVISSOLO HÁPLICO DO SEMIÁRIDO PERNAMBUCANO.....	30
RESUMO.....	31
ABSTRACT.....	33
INTRODUÇÃO.....	34
MATERIAL E MÉTODOS.....	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
CAPÍTULO II. CO-INOCULAÇÃO MHB X <i>Burkholderia</i> <i>sabiae</i> EM SABIÁ NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE FMA.....	55
RESUMO.....	56
ABSTRACT.....	58
INTRODUÇÃO.....	60
MATERIAL E MÉTODOS.....	62
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
APÊNDICES.....	80

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I. ATIVIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM LUVISSOLO HÁPLICO DO SEMIÁRIDO PERNAMBUCANO Pág.

Tabela 1. Características químicas do Luvissole Háplico originário de área com vegetação nativa no município de Sertânia, PE. 36

Tabela 2. Características físicas do Luvissole Háplico originário de área com vegetação nativa no município de Sertânia, PE. 37

Tabela 3. Número de glomerosporos, 100 g solo⁻¹, em área com vegetação nativa no município de Sertânia, PE a partir da contagem direta (CD). 45

Tabela 4. Número de glomerosporos, 100 g solo⁻¹, em área com vegetação nativa no município de Sertânia, PE a partir da contagem indireta (CI). 45

Tabela 5. Número mais provável (NMP) de propágulos infectivos de FMA e quantificação do teor de proteínas do solo relacionadas à glomalina facilmente extraível (PSRGFE) e proteínas do solo relacionadas à glomalina total (PSRGT) em área com vegetação nativa no município de Sertânia, PE. 47

CAPÍTULO II. CO-INOCULAÇÃO MHB X *Burkholderia sabiae* EM SABIÁ NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE FMA

Tabela 1. Características químicas do Luvissole Háplico originário de área com vegetação nativa no município de Sertânia, PE. 62

Tabela 2. Características físicas do Luvissole Háplico originário de área com vegetação nativa no município de Sertânia, PE 62

Tabela 3. Estirpes de rizóbio e mycorrhiza helper bacteria (MHB). 63

Tabela 4. Comprimento da raiz (CR) e altura de planta aos 45, 90 e 110 dias após plantio (DAP) inoculadas com *Burkholderia sabiae* (BR 3405) e co-inoculadas com BR3405 + mycorrhiza helper bactéria (MHB) na presença e ausência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em sabiá. 66

Tabela 5. Massa seca da parte aérea (MSPA), nitrogênio acumulado na MSPA (Nac), massa seca da raiz (MSR), relação massa seca da raiz e da parte aérea (MSR/MSPA) e colonização radicular (CoIR) inoculadas com *Burkholderia sabiae* (BR 3405) e co-inoculadas com BR3405 + mycorrhiza helper bactéria (MHB) na presença e ausência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em sabiá. 68

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I. ATIVIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM LUVISSOLO HÁPLICO DO SEMIÁRIDO PERNAMBUCANO

- Figura 1.** Casa de vegetação do IPA, local onde o experimento foi conduzido. 36
- Figura 2-** Vista geral da cultura-armadilha em casa de vegetação com sorgo granífero (*Sorghum bicolor* L. Moench) e amendoim (*Arachis hypogea* L.) no início do experimento. 38
- Figura 3-** Vista geral da cultura-armadilha em casa de vegetação com sorgo granífero (*Sorghum bicolor* L. Moench) e amendoim (*Arachis hypogea* L.) durante os três meses do experimento. 38
- Figura 4-** Vista da cultura-armadilha em casa de vegetação com sorgo granífero (*Sorghum bicolor* L. Moench) e amendoim (*Arachis hypogea* L.) ao final do 1º ciclo (3 meses). 39
- Figura 5-** Vista geral do NMP em casa de vegetação com milho (*Zea mays* L.) no dia em que foi lançado o experimento. 41
- Figura 6-** Vista geral do NMP em casa de vegetação com milho (*Zea mays* L.) após desbaste, aos 10 dias de experimento. 41
- Figura 7-** Vista geral do experimento NMP em casa de vegetação com milho (*Zea mays* L.) aos 30 dias de cultivo. 42
- Figura 8-** Raízes de milho (*Zea mays* L.) coradas com azul de Trypan (0,05%) em lactoglicerol. 43
- Figura 9-** Lâmina referente à diluição 1: 10 (tubo de nº 10, repetição 5) do NMP contendo fragmentos de aproximadamente 1 cm de raízes de milho (*Zea mays* L.) coradas com azul de Trypan (0,05%) em lactoglicerol. 43
- Figura 10-** Imagens visualizadas em microscópio (400x) referente à lâmina de diluição 1: 10 (tubo de nº 10, repetição 5) de raízes de milho (*Zea mays* L.) coradas com azul de Trypan 0,05% em lactoglicerol, apresentando hifas, vesículas e arbúsculos. 44

CAPÍTULO II - CO-INOCULAÇÃO MHB X *Burkholderia sabiae* EM SABIÁ NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

Figura 1- Eficiência das estirpes em sabiá relacionadas aos tratamentos inoculados com *Burkholderia sabiae* (BR 3405) e co-inoculados com BR3405 + mycorriza helper bacteria (MHB) na presença e ausência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em sabiá. 70

Figura 2- Vista geral do experimento em casa de vegetação com sabiá inoculado isoladamente com BR 3405 e co-inoculado com BR3405 + mycorriza helper bacteria (MHB) na presença e ausência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e testemunha absoluta, aos 110 dias após o plantio. 71

Figura 3- Raízes de sabiá inoculadas isoladamente com *Burkholderia sabiae* (BR 3405) e co-inoculadas com BR3405 + *Brevibacillus brevis* (447) na presença e ausência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e testemunha absoluta (TA). 72

INTERRELAÇÃO BACTÉRIAS (MHB) E FMA: ESTRATÉGIA PARA ESTIMULAR A EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA E MICORRIZAÇÃO DE SABIÁ

RESUMO GERAL

A utilização de plantas associadas simbioticamente, com bactérias fixadoras de N_2 e fungos micorrízicos arbusculares (FMA), constitui uma estratégia eficiente para acelerar a recuperação de áreas impactadas além de reduzir consideravelmente os custos com a mesma. O conceito de “mycorrhiza helper bacteria (MHB)” tem sido introduzido e discutido devido ao efeito sinérgico que essa dupla associação promove às plantas. São bactérias associadas com raízes e FMA que, seletivamente, promovem o estabelecimento da simbiose com os fungos. Deste modo, os objetivos deste trabalho foram verificar a atividade de FMA em área com vegetação nativa do semiárido Pernambucano, no município de Sertânia; determinar o número de glomerosporos e o número mais provável (NMP) de propágulos infectivos; quantificar o teor de proteínas do solo relacionadas à glomalina; determinar a viabilidade da co-inoculação entre bactérias (MHB) e mistura de FMA em sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth) visando obter combinações e compatibilidade de pares simbióticos, assim como avaliar a eficiência e colonização micorrízica. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação na Sede do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). Foram coletadas 10 amostras compostas de solo, sendo os pontos definidos aleatoriamente. As amostras foram homogêneas e analisadas quanto às características físicas e químicas. Amostras compostas foram utilizadas para contagem direta (CD) e multiplicação de FMA para contagem indireta (CI) de esporos, com o uso de culturas-armadilha, empregando sorgo granífero (*Sorghum bicolor* L. Moench) e amendoim (*Arachis hypogea* L.) como plantas hospedeiras (experimento I). Para a determinação do NMP de propágulos infectivos de FMA no Luvisolo Háptico foi utilizado um sistema de diluição em série: 0, 1:10, 1:100 e 1:1000, com 5 repetições cada e, tendo o milho (*Zea mays* L.) como planta hospedeira (experimento II). No experimento III foram utilizados vasos com o solo Luvisolo Háptico (8 kg vaso^{-1}) com pH 6,0 e a planta utilizada foi a sabiá. Na semeadura, foi efetuada inoculação com *Burkholderia sabiae* (BR 3405) e co-inoculação com BR3405 + MHB contendo 10^8 UFC mL^{-1} . Na inoculação com a mistura do FMA, foram utilizados 4 g vaso^{-1} em forma de propágulo, contendo aproximadamente 670 esporos. A colheita foi realizada 110 dias após plantio (DAP) e foram avaliadas as seguintes variáveis: massa seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR), relação MSR/MSPA, altura de planta (AP) nos períodos de 45, 90 e 110 dias, comprimento da raiz (CR), N total acumulado na MSPA (Nac), eficiência das estirpes (E%) e colonização micorrízica. O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados, com arranjo fatorial 9×2 mais uma testemunha absoluta (TA) – sem inoculação; estirpes de MHB e um tratamento controle inoculado apenas com *Burkholderia sabiae* com e sem FMA (mistura de FMA) com 3 blocos. Os resultados dos experimentos mostram que o NMP de propágulos infectivos de FMA encontrados no município de Sertânia foi de $23 \text{ propágulos cm}^{-3}$. As proteínas do solo relacionadas à glomalina facilmente extraível (PSRGFE) e as proteínas do solo relacionadas à glomalina total (PSRGT) ficaram em torno de 0,46 e 0,26 mg g solo^{-1} , respectivamente. A colonização dos FMA em conjunto com as bactérias foi

positiva, como no caso do CR, os tratamentos com BR 3405 + *Azospirillum amazonenses* (Y2) e BR 3405 + *Herbaspirillum seropedicae* (Z67) apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) em relação ao fator com e sem FMA. Confirmando deste modo que, na presença das bactérias MHB houve aumento no comprimento do sistema radicular das plantas de sabiá. A eficiência das estirpes obteve os melhores resultados quando as bactérias estavam em presença de FMA e o tratamento BR 3405 + *Paenibacillus brasilensis* (24) + FMA foi o que obteve melhor resposta. Os tratamentos que receberam os FMA foram superiores em relação aos demais nas variáveis MSPA, MSR, E, Nac, chegando a apresentar uma média em torno de 84% de colonização radicular.

Palavras chave: Fixação biológica de nitrogênio, mycorrhiza helper bacteria, *Mimosa caesalpinifolia*, sinergismo, simbiose, colonização radicular.

BACTERIA (MHB) AND FMA INTERRELATION: A STRATEGY TO STIMULATE THE SYMBIOTIC EFFICIENCY AND MYCORRHIZAL OF SABIÁ

GENERAL ABSTRACT

The use of plants symbiotically associated with N₂ fixing bacteria and mycorrhizal fungi (AMF) provides an efficient strategy to accelerate the recovery of impacted areas and reduces its costs considerably. The term "mycorrhiza helper bacteria" (MHB) has been introduced and discussed due to the synergistic effect that this dual combination promotes to plants. They are bacteria associated with roots and AMF that selectively promote the establishment of symbiosis with fungi. Thus, the objectives were to verify the AMF activity in the area with native vegetation in the Pernambucano semiarid, municipality of Sertânia; determine glomerospores number and the most probable number (MPN) of infective propagules; quantify the content of glomalin-related protein in the soil and determine the feasibility of bacteria (MHB) co-inoculation and AMF mixture in "sabiá" (*Mimosa caesalpinifolia* Benth) aiming at obtaining combinations and compatibility of symbiotic pairs, as well as to evaluate the mycorrhizal efficiency and colonization. The experiments were conducted in greenhouse of the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA). 10 composite soil samples were collected with points were defined at random. Samples were homogenized and analyzed for physical and chemical characteristics. Composite samples were used for direct count (DC) and propagation of AMF for indirect count (IC) of spores, using trap- cultures and sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) and peanut (*Arachis hypogea* L.) as host plants (experiment I). To determine the MPN of infective propagules of AMF in the Haplic Luvisol was used a system of serial dilution: 0, 1:10, 1:100 and 1:1000 with five replicates each, with maize (*Zea mays* L.) as host plant (experiment II). In the experiment III were used pots with Haplic Luvisol soil (8 kg pot⁻¹) at pH 6.0 and the plant used was the "sabiá". On seeding, inoculation with *Burkholderia sabiae* (BR 3405) and co-inoculation with BR3405 + MHB were performed and each seed was inoculated with 2 mL of specific medium for each of MHB bacteria and for the BR3405 containing 10⁸ CFU mL⁻¹. In the inoculation with AMF mixture was used 4 g pot⁻¹ in the form of propagule containing approximately 670 spores. Plants were harvested at 110 days after planting (DAP) and the following variables were evaluated: shoot dry mass (SDM), root (RDM), RDM/SDM ratio, plant height (PH) on periods of 45, 90 and 110 days, root length (RL), total N accumulated in SDM (Nat), strains efficiency (E) and mycorrhizal colonization. The experimental design was randomized blocks, with 9 x 2 factorial arrangement plus an absolute control (AC) - without inoculation; MHB strains and one control treatment inoculated only with *Burkholderia sabiae* with and without AMF (AMF mixture) with 3 blocks. The experimental results show that the MPN of AMF infective propagules found in the city of Sertânia was 23 propagules cm⁻³. Soil proteins related to easily extractable glomalin (PSRGFE) and soil proteins related to total glomalin (PSRGT) were approximately 0.46 and 0.26 mg g soil⁻¹, respectively. The AMF colonization combined with the bacteria was positive, as in the case of RL, treatments with BR 3405 + *Azospirillum amazonenses* (Y2) and BR 3405 + *Herbaspirillum seropedicae* (Z67) showed significant difference by the Tukey test (p <0.05) compared to the factor with and without AMF. Thereby ensuring

that, in the presence of MHB bacteria there was increase in root length of “sabiá” plants. Strains efficiency showed better results when bacteria were in the presence of AMF and the treatment BR 3405 + *Paenibacillus brasilensis* (24) + AMF showed the best response. The treatments that received AMF were higher compared to the others on the variables SDM, RDM, E, Nac, coming to present on average 84% of root colonization.

Keywords: Biological nitrogen fixation, mycorrhiza helper bacteria, *Mimosa caesalpinifolia*, synergism, symbiosis, root colonization.

INTRODUÇÃO GERAL

Uma prática importante e necessária para a agricultura é o uso de microrganismos com o objetivo de melhorar a disponibilidade de nutrientes para as plantas. (FREITAS et al., 2007; BURITY et al., 2000). Os solos juntamente com seus organismos, participam de modo contundente para a manutenção da vida e para o equilíbrio da biosfera. Dentre os microrganismos do solo as bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) e os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) se destacam por exercerem significativo desempenho para a funcionalidade e manutenção dos ecossistemas naturais manejados e degradados (SOUZA et al., 2006). Embora existam outros sistemas fixadores de N_2 , como os microrganismos de vida livre e os microrganismos associativos (SANTOS et al., 2008).

A utilização de plantas associadas simbioticamente, com bactérias fixadoras de N_2 e FMA, constitui uma estratégia eficiente para acelerar a recuperação de áreas impactadas além de reduzir consideravelmente os custos com as mesmas (RESENDE et al., 2011; RESENDE et al., 2005), protegem o solo contra a erosão, produzem uma grande quantidade de massa vegetal rica em nutrientes e estruturam o solo, melhorando as características físicas, químicas e biológicas do solo (SANTANA FILHO et al., 1997).

Por outro lado, a colonização micorrízica de raízes de leguminosas tem sido reportada por estimular a nodulação e fixação de N_2 , especialmente em solos com baixa disponibilidade de P (BONFANTE & ANCA, 2009; REDECKER et al., 1997).

A maioria das plantas do ecossistema terrestre interage com os fungos micorrízicos (SMITH & READ, 2008). Os FMA colonizam o sistema radicular das mais diversas plantas, de Gimnospermas a Angiospermas, de Pteridófitas a Briófitas (MOREIRA, 2006). Apresentando como principais efeitos: a extensão do sistema radicular a partir de suas hifas; aumento na absorção de água e de nutrientes do solo pelas plantas (principalmente os de baixa mobilidade como o P); aumenta à sobrevivência das plantas no período de seca ou no transplante de mudas; atua como agente de controle biológico; são considerados fator importante para a manutenção da biodiversidade e funcionalidade dos ecossistemas; além de serem responsáveis pela produção

de glomalina (FIGUEIREDO et al., 2008; MERGULHÃO et al., 2008; MIRANDA, 2008).

Segundo Garbaye (1994) o conceito de mycorrhiza helper bacteria (MHB), tem sido introduzido e discutido, e o efeito da MHB tem sido estudado em vários tipos de plantas em ecossistemas temperados, embora poucos estudos tenham sido focados em plantas tropicais (FREY-KLETT et al., 2007). As MHB podem ajudar a formação de micorriza ou promover o funcionamento de sua simbiose, tanto em sistemas arbusculares quanto em sistemas ectomicorrízicos (FREY-KLETT et al., 2007).

A sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.), é considerada uma árvore de múltiplo uso, principalmente por ser fixadora de N₂, sem contar que é uma planta forrageira de alto valor proteico, sua madeira pode ser utilizada como estaca e caibro ou carvão vegetal e lenha (como fonte de energia), a planta em si pode ser também utilizada como cerca viva, além de ser fonte riquíssima de pólen e néctar para as abelhas (CAMPANHA & ARAÚJO, 2010; LIMA, 2008; SILVA, 2008; CARVALHO, 2007; FIGUEIRÔA et al., 2005; STAMFORD et al., 1997). E ao se tratar de sabiá sem acúleos, o interesse é justamente voltado para madeiras menos atacadas por cupins (utilizadas em cerca e apriscos), um melhor sistema operacional tanto no manejo quanto na exploração da madeira, se obter uma melhor circulação dos animais, além de estimular seu emprego em programas de reflorestamento (ALENCAR et al., 2011; CARVALHO et al., s. d.).

Deste modo, os objetivos deste trabalho foi verificar a atividade de FMA em área com vegetação nativa do semiárido Pernambucano, no município de Sertânia; quantificar o teor de proteínas do solo relacionadas à glomalina; determinar a viabilidade da co-inoculação entre bactérias (MHB) e mistura de FMA em sabiá visando obter combinações e compatibilidade de pares simbióticos, assim como avaliar a formação micorrízica (colonização de raiz e esporulação).

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Fixação Simbiótica de Nitrogênio

Um dos principais macronutrientes requeridos pelos vegetais é o nitrogênio, considerado o elemento mais abundante na atmosfera terrestre (em torno de 79%), está presente principalmente na forma diatômica (N_2) (LODEIRO et al., 2000). Nas plantas é constituinte essencial de aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucléicos, hormônios, clorofila, entre outros (SANTOS et al., 2008).

Apenas uma parcela relativamente pequena das espécies de procariotos possui a enzima nitrogenase que é capaz de reduzir o N_2 , quebrando a tripla ligação entre os átomos de N, para a forma inorgânica combinada NH_3 que pode então, tornar-se disponível para plantas e microrganismos, os quais são chamados de fixadores de N_2 ou diazotróficos (SANTOS et al., 2008; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

A habilidade das bactérias do gênero *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Devosia*, *Herbaspirillum*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, para fixar nitrogênio em simbiose com leguminosas é de considerável importância agrícola (SANTOS et al., 2008; FREITAS et al., 2007). As plantas da família da *Leguminosae* podem conseguir uma parte ou a totalidade de sua nutrição nitrogenada diretamente do ar, devido às suas associações com os rizóbios (SANTOS et al., 2008). Estas relações simbióticas, é que permitem as leguminosas serem independente dos níveis de nitrogênio no solo (CASTRO & FERREIRA, 2011).

Maximizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN), otimizar a distribuição e o emprego dos compostos nitrogenados dentro das plantas e tornar mais eficiente a utilização de carboidratos pelos nódulos é o que os países em desenvolvimento e os desenvolvidos têm buscado como alternativas para a adubação nitrogenada, devido a subida vertiginosa dos preços dos adubos nitrogenados em consequência ao consumo de energia fóssil em sua fabricação, aliada aos graves problemas de poluição causados pelo uso intensivo desses adubos (DAKORA, 2003; HUNGRIA et al., 2003). O nitrogênio

fixado pelos rizóbios pode representar uma alternativa aos fertilizantes químicos nitrogenados, com as vantagens de ser economicamente mais viável e não agredir ao solo.

O crescimento e a produção das leguminosas são em parte, o resultado da interação entre as plantas, as estirpes de rizóbios e as condições ambientais em que o sistema simbiótico se desenvolve e que influenciam o processo de fixação biológica do nitrogênio (RUMJANEK et al., 2005).

É necessária a obtenção de estirpes de rizóbios de alta qualidade, capazes de sobreviver e competir pela fixação eficiente do nitrogênio atmosférico na leguminosa alvo, já que há uma diversidade muito grande de espécies nativas e estas podem vir a fixar o nitrogênio, embora com um grau de eficiência muito inferior (FIGUEIREDO et al., 2008; MOREIRA, 2006; SILVEIRA et al., 2000; MOAWAD et al., 1998).

Fungos Micorrízicos Arbusculares - FMA

Os fungos micorrízicos compartilham a característica de formarem estruturas especializadas dentro do córtex radicular das plantas e crescerem além da superfície das raízes, diferenciando hifas, micélio e esporos no solo rizosférico (STÜRMER et al., 2009).

Dos microrganismos do solo, os mais intimamente e obrigatoriamente associados ao sistema radicular são os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (BERBARA et al., 2006), atualmente pertencentes ao filo Glomeromycota, com 3 classes (*Archaeosporomycetes*, *Glomeromycetes*, e *Paraglomeromycetes*), composto por 5 ordens (*Archaeosporales*, *Diversisporales*, *Gigasporales*, *Glomerales* e *Paraglomerales*), 14 famílias, 29 gêneros e com cerca de 230 espécies descritas (OEHL et al., 2011).

Dentre os 7 grupos de micorrizas, a micorriza arbuscular (MA) é a predominante em solos tropicais, e é caracterizada por formar os arbúsculos dentro das raízes das plantas, estrutura na qual se realiza a troca de nutrientes entre a planta e o fungo (STÜRMER et al., 2009; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

As MA formam a mais ampla simbiose (mutualística) entre fungos e plantas na natureza e desempenham importante papel no equilíbrio das

comunidades vegetais (TORO & NICHOLS, 2011; BONFANTE & ANCA, 2009; MAIA & CAVALCANTI, 2005). São importantes componentes da microbiota do solo, em ecossistemas agrícolas e naturais contribuindo para a vida do planeta (MERGULHÃO et al., 2011).

Dentre alguns dos seus benefícios, podemos destacar a maior absorção de água e nutrientes pelas plantas. Segundo Bonfante & Anca (2009), para uma absorção eficiente de nutrientes, a maioria das plantas terrestres precisam estar associadas a fungos micorrízicos, fazendo com que essas plantas aumentem a sua produtividade e a sua resistência ao estresse. Isso ocorre através da maior exploração da rizosfera pelas hifas dos FMA, que em troca recebem das plantas carboidratos que são essenciais ao seu ciclo (BONFANTE & ANCA, 2009).

Podemos citar também, como contribuições dos FMA a produção de glomalina, a qual esta associada à agregação de partículas e ao processo de armazenamento de carbono do solo (MERGULHÃO et al., 2008), tolerância a doenças radiculares (MUNYANZIZA et al., 1997), resistência a seca (AL-KARAKI et al., 2004), recuperação de áreas degradadas (BONFIM, 2011; FRANCO et al., 1995).

Segundo Franco (1995), espécies de leguminosas arbóreas associadas à FMA, é uma estratégia de grande viabilidade econômica e biológica para a recuperação de áreas degradadas. Miranda (2008) reforça que a micorriza é um componente natural importante dos ecossistemas tropicais e agroecossistemas, tanto na sua funcionalidade quanto na sua sustentabilidade. Stürmer et al. (2009) os considera um grupo chave por contribuírem com a nutrição vegetal, melhorar as estruturas do solo e das comunidades vegetais e servirem como elo entre o sistema geoquímico e biológico nos ecossistemas terrestres.

Mycorrhiza Helper Bacteria- MHB

Segundo Garbaye (1994) o conceito de “mycorrhiza helper bacteria (MHB)” tem sido introduzido e discutido devido ao efeito sinérgico que essa dupla associação promove às plantas. Garbaye (1994) a define como, bactérias associadas com raízes e FMA que, seletivamente, promovem o estabelecimento da simbiose com os fungos. Apesar de bastante estudadas em ecossistemas temperados, poucos estudos têm sido focados em plantas tropicais (FREY-KLETT et al., 2007).

O estabelecimento das simbioses micorrízicas pode ser positivamente influenciado por certos isolados de bactérias, efeito este exibido pela MHB (GARBAYE, 1994). As MHB são muito comuns, sendo encontradas em condições muito diferentes e em diferentes associações de plantas com fungos (RIGAMONTE et al., 2010).

A MHB pode atuar em sistemas arbusculares e ectomicorrízicos (FREY-KLETT et al., 2007). É importante relatar que uma das características importante da MHB é a sua especificidade por fungos micorrízicos, muitas vezes pode ajudar a aumentar a formação de micorriza (por FMA), e promover o estabelecimento da simbiose tais como: estimulação da extensão micelial; intensificando o contato do fungo com raiz e a colonização, e reduzindo o impacto ambiental adverso às condições dos micélios dos fungos micorrízicos (FREY-KLETT et al., 2007). Ainda, segundo Frey-Klett et al. (2007) a germinação de esporos e o crescimento micelial podem ser intensificados pela MHB através da produção de fatores de crescimento, através da desintoxicação de substâncias antagonistas, ou através da inibição de competidores e antagonistas.

As MHB têm sido identificadas em muitos grupos de bactérias e gêneros tais como: Gram-negativas Proteobacteria (*Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Rhizobium*), Gram-positivas Firmicutes (*Bacillus*, *Brevibacillus*, e *Paenibacillus*) e Gram-positivas Actinomicetos (*Rhodococcus*, *Streptomyces* e *Arthrobacter*); o que demonstra a diversidade de bactérias com uso potencial em processos biotecnológicos (FREY-KLETT et al., 2007).

Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth)

A *Mimosa caesalpinifolia* é vulgarmente conhecida como sabiá, angiquinho-sabiá, sansão-do-campo, unha-de-gato e cebiá. (CARVALHO, 2007; FIGUEIRÔA et al., 2005), e pertence à família Leguminosae e subfamília Mimosoideae (LORENZI, 2002). É uma planta arbórea que ocorre naturalmente na região do Nordeste brasileiro, especialmente em áreas de caatinga (FIGUEIRÔA et al., 2005).

Árvore perenifólia, dotada ou não de acúleos, muito ramificada, composta de folhas bipinadas, alternas, geralmente com seis pinas opostas, cada uma com quatro a oito folíolos glabros chegando a atingir 8 cm de comprimento. Suas inflorescências são em forma de espigas cilíndricas, com 5 a 10 cm de comprimento com flores brancas e bissexuais (CARVALHO, 2007). Os frutos são legumes articulados, planos, de até 10 cm de comprimento e até 13 mm de espessura. As sementes são lisas e duras, medindo 5 a 8 mm de diâmetro e apresentam dormência tegumentar (FIGUEIRÔA et al., 2005).

Desenvolve-se bem, em áreas degradadas e em local onde tenha havido exposição do subsolo, graças a sua baixa exigência em fertilidade e umidade dos solos (SILVA et al. 2008; CARVALHO, 2007). Segundo Silva et al. (2009), a leguminosa sabiá pode proporcionar melhoria na estrutura do solo, além de incorporar matéria orgânica ao solo e servir como cobertura vegetal.

A folhagem de sabiá constitui valiosa forragem para os bovinos, caprinos e ovinos durante a longa estiagem do sertão do semiárido (LIMA, 2008; SILVA, 2008), além de ter alto teor proteico (STAMFORD et al., 1997).

A sabiá também apresenta considerável rusticidade e crescimento rápido, por isso é extensamente cultivada, podendo ser explorada entre 4 e 6 anos de idade, obtendo estacas e caibros para cerca, com diâmetro de aproximadamente 8 cm (CARVALHO, 2007). Sendo uma das mais promissoras, principalmente, pelo seu potencial para usos como: produção de carvão vegetal e lenha (fonte de energia), (CAMPANHA & ARAÚJO, 2010; CARVALHO, 2007). Além de ser considerada, uma planta que representa importante fonte de pólen e néctar para as abelhas (FIGUEIRÔA et al., 2005).

De acordo com Lima Filho et al. (1992), o interesse pelas espécies leguminosas arbóreas tem aumentado principalmente pela capacidade de fixar

N₂. E quando associadas aos FMA, aumentam a capacidade de absorção de água e nutrientes do solo, principalmente os de baixa mobilidade como o P (MIRANDA, 2008). Segundo Burity et al. (2000) a sabiá é uma leguminosa considerada indispensável em qualquer programa de reflorestamento na região Nordeste, principalmente no semiárido.

Nos últimos anos, vários povoamentos artificiais têm sido implantados no Nordeste, em decorrência do interesse despertado pela espécie, para comercialização de estacas. Entretanto, é necessário o estabelecimento de um Programa de Melhoramento de Sabiá, com o objetivo de aumentar as produtividades madeireira e forrageira e melhorar outras características desejáveis. A seleção de plantas sem acúleos é possível, uma vez que estas ocorrem em povoamentos naturais. A formação de populações de indivíduos sem acúleos facilitará o manejo, além de estimular a sua utilização em programas de recuperação de áreas degradadas na região e, em particular, a sua utilização como forrageira (DRUMOND, s. d.).

A ausência de acúleos é recomendável para o uso da sabiá como forrageira, permitindo uma melhor circulação de animais e de seus tratadores e diminuindo os riscos de ferimentos, e também para a obtenção de estacas (CARVALHO et al., s. d.).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-KARAKI, G.; MCMICHAEL, B.; ZAK, J. Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 14, p. 263-269, 2004.

BONFANTE, P. & ANCA, I.A. Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions. **Annu. Rev. Microbiol.**, 63:363–83, 2009.

BONFIM, J. A. **Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em áreas restauradas de Mata Atlântica, São Paulo, Brasil**. 2011. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ/USP, ao Paulo, 2011.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 3 ed. Mossoró: ESAM 1976, 540p.

BURITY, H.A.; LYRA, M. do C.C.P. de; SOUZA, E.S. de; MERGULHÃO, A.C. do E.S.; SILVA, M.L.R.B. da. Efetividade da inoculação com rizóbios e fungos micorrízicos arbusculares em mudas de sabiá submetidas a diferentes níveis de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.4, p.801-807, 2000.

CARVALHO, P. E. R. **Sabiá – *Mimosa caesalpinifolia***. Embrapa-CNPQ, 10p., 2007 (Embrapa-CNPQ, Circular Técnica, 135).

CARVALHO, J. H. de.; MAIA, C. M. N. de A.; AMORIM, G. C. de. **Seleção de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) sem acúleos no Meio Norte**. Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro, s. d.

CASTRO, I. V. & FERREIRA, E. Nitrogen fixing symbioses adapted to contaminated soils. In: ARAÚJO, A. S. F. de; FIGUEIREDO, M. do V. B. **Microbial Ecology of Tropical Soils**. Nova Science Publishers. p. 1-18, 2011.

DAKORA, F. D. Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. **New Phytologist** 158 : 39-49, 2003.

DRUMOND, M. A.; OLIVEIRA, V. R. de; LIMA, M. F. ***Mimosa caesalpinifolia*: Estudos de melhoramento genético realizados pela Embrapa Semiárido**. Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro, s. d.

FIGUEIREDO, M. V. B.; JUNIOR, M. A. L.; ARAÚJO, A. S. F.; MARTINEZ, C. R. Fatores bióticos e abióticos à fixação biológica de N₂. Parte I – FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO N₂. In: FIGUEIREDO, M. do V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E. de R. e S. **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura**. 1.ed. Guaíba, Agrolivros. p. 43-68, 2008.

FIGUEIRÔA, J. M. de; PAREYN, F. G. C.; DRUMOND, M.; ARAÚJO, E. de L. Madeiras. In: SAMPAIO, E. V. S. B.; PAREYN, F. G. C.; FIGUEIRÔA, J. M. de; SANTOS JÚNIOR, A. G. (Eds.). **Espécies da flora nordestina de importância econômica potencial**. Recife: Associação Plantas do Nordeste, p. 101–133, 2005.

FRANCO, A. A.; DIAS, L. E.; FARIA, S. M. de; CAMPELLO, E. F. C.; SILVA, E. M. R. da. Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agentes de recuperação e manutenção da vida do solo: um modelo tecnológico. **Oecologia Brasiliensis**. Volume I: Estrutura, funcionamento e manejo de ecossistemas brasileiros. p. 459-467, 1995.

FREITAS, S. S. Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas In: **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. (Ed.) Adriana Parada Dias da Silveira; Sueli dos Santos Freitas. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 10-27, 2007.

FREY-KLETT, P.; GARBAYE, J.; TARKKA, M. The mycorrhiza helper bacteria revisited. **New Phytologist**, v. 176, p. 22-36, 2007.

GARBAYE, J. Mycorrhiza helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, v. 128, p. 197–210, 1994.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, p. 88-93, 2003.

LIMA FILHO, J. M. P.; DRUMOND, M. A & MACEDO, D. S. Comportamento fisiológico da Leucena e Albizio sob condições semi-áridas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27 (4) p. 537-542, 1992

LIMA, I. C. A. R. de.; LIRA, M. de. A.; MELLO, A. C. L. de.; SANTOS, M. V. F. dos.; FREITAS, E. V. de.; FERREIRA, R. L. C. Avaliação de sabiazeiro (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) quanto a acúleos e preferência por bovinos. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 3, n. 3, p. 289-294, 2008.

LORDEIRO, A. R.; GONZÁLEZ, P.; HERMÁNDEZ, A.; BALAGUÉ, L. J.; DAVELUKES, G. Comparison of drought tolerance in nitrogen – fixing and inorganic nitrogen – grow common beans. **Plant Science**, v. 154, p. 31-41, 2000.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, v. 1, 4. ed. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 368p., 2002.

MAIA, L. C. & CAVALCANTI, U. M. T. Respostas fisiológicas de plantas micorrizadas. **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, p. 405-415, 2005.

MERGULHÃO, A. C. do E. S.; LYRA, M. do C. C. P. de; SILVA, M. L. R. B. da; OLIVEIRA, J. de P. Arbuscular mycorrhizal fungi in degraded areas. In: ARAÚJO, A. S. F. de; FIGUEIREDO, M. do V. B. **Microbial Ecology of Tropical Soils**. Nova Science Publishers. p. 249-263, 2011.

MIRANDA, J. C. C. de. **Cerrado: micorriza arbuscular: ocorrência e manejo**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 15-18, 2008.

MOREIRA, F. M. S. Nitrogen-fixing Leguminosae-nodulating bacteria. In: Moreira, F. M. S, Siqueira, J. O., Brussaard, L. **Soil biodiversity in Amazonian and other brazilian ecosystems**. Wallingford: CAB International Publishing, p. 237-270, 2006.

MUNYANZIZA, E.; KEHRI, H. K.; BAGYARAJ, D. J. Agricultural intensification, soil biodiversity and agro-ecosystem function in the tropics: the role of mycorrhiza in crops and trees. **Applied Soil Ecology**, v.6, p.77-85, 1997.

OEHL, F.; SIEVERDING, E.; PALENZUELA, J.; INEICHEN, K.; SILVA, G. A. da. Advances in *Glomeromycota* taxonomy and classification. **IMA Fungos**, v. 2, p. 191-199, 2011.

REDECKER, D.; VON BERSWORDT-WALLRABE, P.; BECK, D.P.; WERNER, D. Influence of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi on the 15N/14N ratio in *Phaseolus vulgaris*. **Biology and Fertility of Soils** 24: 344-346, 1997.

RESENDE, A. S.; FRANCO, A. A.; MACEDO, M. O.; CAMPELO, E. F. C. Estresses ambientais danos e benefícios em plantas. In: **Leguminosas associadas a microrganismos como estratégia de recuperação de áreas degradadas**, p. 475-489, 2005.

RESENDE, A. S. de; CHAER, G. M.; CAMPELLO, E. F. C.; FARIA, S. M. de Use of Nitrogen-fixing legume trees to revegetate degraded lands. In: ARAÚJO, A. S. F. de; FIGUEIREDO, M. do V. B. **Microbial Ecology of Tropical Soils**. Nova Science Publishers. p. 19-29, 2011.

RIGAMONTE, T. A.; PYLRO, V. S.; DUARTE, G. F. The role of mycorrhization helper bacteria in the establishment and action of ectomycorrhizae associations. **Brazilian Journal of Microbiology**, 41: 832-840, 2010.

RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. Fixação biológica de nitrogênio. In: Freire Filho, F.R.; Lima, J.A. de A.; Ribeiro, V.Q. (Ed.). **Feijão: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 347-417, 2005.

SANTANA FILHO, S.; CARDOSO, I. M.; PEREIRA NETO, J. T. Utilização de compostos orgânico de lixo urbano na recuperação de áreas degradadas. In: **III Simpósio Nacional de Áreas Degradadas – SINRAD**, Viçosa: SOBRADE/UFV, p. 403-406, 1997.

SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; COLAÇO, W. Fixação simbiótica de N₂ em leguminosas tropicais. Parte I – FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO N₂. In: FIGUEIREDO, M. do V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E. de R. e S. **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura**. 1.ed. Guaíba, Agrolivros. p. 17-41, 2008.

SILVA, A. da; AGUIAR, I. D. de; FIGLIOLIA, M. B. Germinação de sementes de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (sansão-do-campo) sob diferentes condições de temperatura, luz e umidade. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo v. 20, n. 2, p. 139-146, dez. 2008.

SILVA, M. B. R.; VIÉGAS, R. A.; DANTAS NETO, J.; FARIAS, S. A. R. Estresse salino em plantas da espécie florestal sabiá. **Caminhos de Geografia**, v. 10, n. 30, p. 120-127, 2009.

SILVEIRA, P. M.; ZIMMERMANN, F. J. P.; SILVA, S. C. da; CUNHA, A. A. da. Amostragem e variabilidade espacial de características químicas de um latossolo submetido diferentes sistemas de preparo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n.10, p. 2057-2064, out. 2000.

SMITH, S.E; READ, D. **Mycorrhizal Symbiosis**. Academic Press, London, 800p., 2008.

SOUZA, V. C.; SILVA, R. A.; CARDOSO, G. D.; BARRETO, A. F. Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.10, n.3, p. 612–618, 2006.

STAMFORD, N. P.; ORTEGA, A. D.; TEMPRANO, F.; SANTOS, D. R. Effects of phosphorus fertilization and inoculation of *Bradyrhizobium* and mycorrhizal fungi on growth of *Mimosa caesalpiniaefolia* in an acid soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 29, n. 5, p. 959-964, 1997.

STÜRMER, S. L.; CARDOSO, E. J. B. N.; SOUZA, F. A. de.; KASUYA, M. C. M. "Além das raízes": o papel dos fungos micorrízicos. **Boletim Informativo da SBCS**, p. 30-32, jan.- abr. 2009.

TORO, M. & NICHOLS, K. Glomalin as na incator of mycorrhizae in tropical agroecosystems. In: ARAZJO, A. S. F. & FIGUEIREDO, M. V. B. **Microbial ecology of tropical soils**. New York, Nova Science Publishers, Inc., p. 207-247, 2011.

CAPÍTULO I

ATIVIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM LUVISSOLO HÁPLICO DO SEMIÁRIDO PERNAMBUCANO

ATIVIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM LUVISSOLO HÁPLICO DO SEMIÁRIDO PERNAMBUCANO

RESUMO

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) formam a mais ampla simbiose entre fungos e plantas na natureza e desempenham importante papel no equilíbrio das comunidades vegetais. Eles ocorrem na maioria dos solos e em cerca de 90% das plantas vasculares. Suas hifas atuam como uma extensão do sistema radicular, explorando áreas que normalmente as plantas não colonizadas não conseguiriam, favorecendo a absorção de água, nutrientes dentre outros benefícios. O uso de microrganismos com o objetivo de melhorar a disponibilidade de nutrientes para as plantas é uma prática importante e necessária para a agricultura. Assim, trabalhos sobre a atividade de FMA no Nordeste do Brasil e testes de eficiência utilizando plantas nativas da região vêm se intensificando nas últimas décadas. Portanto, o objetivo desse estudo foi determinar o número mais provável (NMP) de propágulos infectivos em área com vegetação nativa do semiárido Pernambucano, no município de Sertânia, assim como quantificar o teor de proteínas do solo relacionadas à glomalina total (PSRGT) e facilmente extraível (PSRGFE). Os experimentos foram conduzidos na casa de vegetação na Sede do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). Foram coletadas 10 amostras compostas de solo, sendo os pontos definidos aleatoriamente. As amostras foram homogeneizadas e analisadas quanto às características físicas e químicas. Amostras compostas foram utilizadas para contagem direta (CD) e multiplicação de FMA para contagem indireta (CI) de esporos, com o uso de culturas-armadilha, empregando sorgo granífero (*Sorghum bicolor* L. Moench) e amendoim (*Arachis hypogea* L.) como plantas hospedeiras (experimento I). Para a determinação do NMP de propágulos infectivos de FMA no Luvisolo Háptico foi utilizado um sistema de diluição em série: 0, 1:10, 1:100 e 1:1000, com 5 repetições cada e, tendo o milho (*Zea mays* L.) como planta hospedeira (experimento II). Na CD e CI foram encontrados valores 961,3 e 517,4 glomerosporos 100g solo⁻¹ respectivamente. O NMP de propágulos infectivos de FMA encontrados no município de Sertânia foi de 23 propágulos cm⁻³ e as

proteínas do solo relacionadas à PSRGFE e as proteínas do solo relacionadas à PSRGT ficaram em torno de 0,46 e 0,26 mg g solo⁻¹, respectivamente.

Palavras chave: NMP, glomalina, número de glomerosporos, cultura-armadilha, *Zea mays*, *Arachis hypogea*.

ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI ACTIVITY IN HAPLIC LUVISOL OF THE PERNAMBUCANO SEMIARID

ABSTRACT

The arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) form the broadest symbiosis between fungi and plants in nature and play an important role in the balance of plant communities. They occur in most soils and about 90% of vascular plants. Their hyphae act as extension of the root system, exploring areas that normally the non-colonized plants would not be able to, favoring the absorption of water, nutrients, among other benefits. The use of microorganisms aiming at improving nutrient availability to plants is an important and necessary practice for agriculture. Thus, studies on the AMF occurrence in northeastern Brazil and efficiency tests using native plants in the region have been intensified in recent decades. Therefore, the aim of this study was to determine the most probable number (MPN) of infective propagules in the area with native vegetation in the Pernambuco semiarid, municipality of Sertânia, and quantify the soil protein content related to total glomalin (PSRGT) and to easily extractable glomalin (PSRGFE). The experiments were conducted in greenhouse of the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA). 10 soil composite samples of soil were collected and points were set at random. Samples were homogenized and analyzed for physical and chemical characteristics. Composite samples were used for direct count (DC) and AMF propagation for indirect count (IC) of spores, using trap-cultures and sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) and peanut (*Arachis hypogea* L.) as host plants (experiment I). To determine the MPN of infective propagules of AMF in the Haplic Luvisol was used a system of serial dilution: 0, 1:10, 1:100 and 1:1000 with five replicates each, with maize (*Zea mays* L.) as host plant (experiment II). It was found in the DC and IC 961.3 and 517.4 glomerospores 100g soil⁻¹ respectively. It was found that the MPN of AMF infective propagules found in the municipality of Sertânia was 23 propagules cm⁻³. Soil proteins related to PSRGFE and soil proteins related to PSRGT were approximately 0.46 and 0.26 mg⁻¹ g soil, respectively.

Keywords: MPN, glomalin, glomerospores number, trap- culture, *Zea mays*, *Arachis hypogea*.

INTRODUÇÃO

A microbiota edáfica é um componente essencial do sistema solo-planta (GOMIDE et al., 2009). Dos microrganismos do solo, os mais intimamente e obrigatoriamente associados ao sistema radicular são os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (BERBARA et al., 2006), pertencentes ao filo Glomeromycota (OEHL et al., 2011).

As micorrizas arbusculares formam a mais ampla simbiose (mutualística) entre fungos e plantas na natureza e desempenham importante papel no equilíbrio das comunidades vegetais (TORO & NICHOLS, 2011; BONFANTE & ANCA, 2009; MAIA & CAVALCANTI, 2005). Os FMA ocorrem na maioria dos solos e em cerca de 90% das plantas vasculares, desde as regiões árticas até os trópicos, colonizando raízes de plantas nativas e cultivadas, anuais e perenes (WANG; QIU, 2006).

A população dos FMA no solo, por meio da multiplicidade de suas espécies, é considerada um dos fatores mais importantes para a manutenção da biodiversidade e funcionalidade dos ecossistemas (HEIJDEN et al., 1998).

Suas hifas atuam como uma extensão do sistema radicular, absorvendo uma quantidade bem maior de nutrientes que o alcançado por raízes não colonizadas (MIRANDA, 2008). A principal vantagem dessas hifas está relacionada ao fato de absorverem com maiores facilidades nutrientes com baixa mobilidade no solo, como é o caso do P (MIRANDA & HARRIS, 1994a). O micélio dos FMA também agrega as partículas do solo (RILLIG & MUMMEY, 2006) e atua no processo de estoque de carbono do solo por meio da produção da glomalina, uma glicoproteína (MERGULHÃO et al., 2008; WRIGHT, 2005; CORNIS, 2002). Substância viscosa, com capacidade adesiva (MERGULHÃO et al., 2011), que além de favorecer a formação de agregados estáveis no solo (WRIGHT et al., 2007; WRIGHT & UPADHYAYA, 1998), apresenta a capacidade de sequestrar metais pesados, reduzindo a disponibilidade e o risco de toxicidade destes elementos (GONZÁLEZ-CHÁVEZ et al., 2004).

Há evidências de que a inoculação com fungos micorrízicos aumente a utilização de fosfato de rocha (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006), e pode aumentar a absorção de água pela planta, e aumente também a sobrevivência das plantas no período de seca (LINDERMAN, 2000) ou no transplântio de

mudas (COLOZZI-FILHO et al., 1994; MENGE et al., 1978a). E ainda oferecer resistência a certos patógenos radiculares (LINDERMAN, 1992).

Também são importantes para o processo de nodulação de várias espécies das leguminosas (GERDEMANN, 1975). Em solos com problemas de fertilidade, as endomicorrizas estimulam fortemente a nodulação devido a uma melhor absorção de fósforo (BURITY et al., 2000). Recomenda-se, portanto, o plantio de árvores fixadoras de N₂, e FMA para contribuir na agregação de partículas, uso eficiente da água e nutrientes, além da proteção contra a erosão dos solos.

O uso de microrganismos com o objetivo de melhorar a disponibilidade de nutrientes para as plantas é uma prática importante e necessária para a agricultura (FREITAS et al., 2007; BURITY et al., 2000).

Alguns trabalhos sobre a ocorrência de FMA no Nordeste do Brasil podem ser citados: Maia & Trufem (1990), Melo et al. (1997) e Maia & Gibertoni (2002) relatando a diversidade de FMA em áreas naturais e cultivadas de Pernambuco, Silva et al. (2005) que mencionam a diversidade em áreas naturais e impactadas por mineração na caatinga baiana e Lima et al. (2002) com a influência de FMA no crescimento de mudas de leucena em solos de caatinga impactados ou não por atividade mineradora.

Deste modo o objetivo do trabalho foi verificar atividade de FMA a partir da avaliação do número mais provável (NMP) de propágulos infectivos e densidade de glomerosporos em área com vegetação nativa do semiárido Pernambucano, no município de Sertânia, e quantificar o teor de proteínas do solo relacionadas à glomalina.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de Estudo e Amostragem

O solo utilizado foi o Luvisolo Háptico, antigo Bruno não Cálcico, (EMBRAPA Solos, s.d.) proveniente da Estação Experimental do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) de Sertânia – PE, 08° 04' 25" S e 37° 15' 52" W a uma altitude de 558 m (EMBRAPA Monitoramento por Satélite, s.d.). O clima do município de Sertânia, segundo a classificação de Koeppen é semiárido quente. A taxa pluviométrica anual no município é de 635 mm, com período de sete meses de estiagem, sendo que os maiores valores anuais de

pluviometria ocorrem nos meses de março e abril, enquanto que a temperatura média anual de 25° C.

A partir de uma amostragem realizada em zig-zag, foram coletadas 20 amostras compostas de solo de uma área com vegetação nativa (0-20 cm de profundidade) na região da rizosfera. Para cada ponto foram coletadas três subamostras simples ao redor da copa, quando se tratava de uma arbórea ou ao redor da folhagem de uma herbácea, quando o caso. Para cada 2 pontos coletados formou-se 1 amostra composta, totalizando 10 amostras. O solo coletado foi peneirado (malha de 2,0 mm de diâmetro) e cada amostra homogeneizada. Parte das amostras foi destinada a contagem direta (CD) e parte destinada aos experimentos e análise quanto às características químicas (Tabela 1) e físicas (Tabela 2) segundo a metodologia recomendada pela EMBRAPA (1997).

Os experimentos I e II foram conduzidos na casa de vegetação da Sede do Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA (Figura 1), sendo que as determinações de glomalina foram efetuadas na Universidade Federal de Pernambuco- UFPE- Laboratório de Micorriza.

Figura 1- Casa de vegetação do IPA, local onde o experimento foi conduzido.



Tabela 1. Características químicas do Luvisolo Háplico originário de área com vegetação nativa no município de Sertânia, PE.

Área	P	Ca	Mg	K	Na	Al	H	CTC	pH
	mg dm ⁻³	Cmolc dm ⁻³						H ₂ O 1:2,5	
Sertânia – PE	12	3,9	1,95	0,32	0,18	-	3,3	9,6	6,0

Tabela 2. Características físicas do Luvissole Háplico originário de área com vegetação nativa no município de Sertânia, PE.

Área	Granulometria (%)				Umidade Residual	ds	dp
	Areia Grossa	Areia Fina	Silte	Argila	%	g cm ⁻³	
Sertânia – PE	50	19	21	10	2,0	1,61	2,65

*Densidade do solo (ds), **Densidade da partícula (dp).

Experimento I- Quantificação de glomerosporos

As amostras compostas foram utilizadas para contagem direta (CD) de glomerosporos, e indireta (CI), a partir do preparo de culturas-armadilha (Sieverding, 1991), empregando sorgo granífero (*Sorghum bicolor* L. Moench.) e amendoim (*Arachis hypogea* L.) como plantas hospedeiras. As amostras foram acondicionadas em vasos (dez no total) e mantidas em casa de vegetação durante um ciclo de multiplicação (três meses). Cada vaso plástico (com capacidade de 3 kg solo vaso⁻¹) foi preenchido com 1 kg de solo referente a um ponto (dos 10 pontos) e com 1 kg de areia lavada autoclavada (diluyente), ficando assim na proporção de 1:1.

Nas sementes de amendoim, devido à contaminação com fungos, foi efetuada a desinfestação por meio de imersão em álcool a 70%, por 30 segundos, em seguida por 1 minuto em hipoclorito de sódio a 0,2%, e posteriormente lavadas com água destilada e autoclavada (esterelizada), por sete vezes (VINCENT, 1970 modificada por SILVA, 2011).

O sorgo foi semeado diretamente nos vasos, cada vaso recebeu 100 sementes, no momento em que foram transplantadas as plântulas de amendoim, duas plântulas por vaso (Figura 2). Sendo assim, cada vaso recebeu duas plântulas de amendoim e 100 sementes de sorgo.

Figura 2- Vista geral da cultura-armadilha em casa de vegetação com sorgo granífero (*Sorghum bicolor* L. Moench) e amendoim (*Arachis hypogea* L.) no início do experimento.



A cultura-armadilha não recebeu nenhum tipo de adubo ou de solução nutritiva, tendo como fonte de nutrientes para as plantas o próprio solo (Tabelas 1 e 2). A manutenção da umidade se deu a partir da rega realizada com água destilada. A mesma se estendeu por um período de três meses (Figura 3) e ao término deste período os vasos passaram por um período de seca, onde foi cessada a rega, para facilitar a germinação e a quebra de dormência dos glomerosporos, compondo desse modo o 1º ciclo dessa cultura (Figura 4).

Figura 3- Vista geral da cultura-armadilha em casa de vegetação com sorgo granífero (*Sorghum bicolor* L. Moench) e amendoim (*Arachis hypogea* L.) durante os três meses do experimento.



Passado o período de estresse hídrico, foram coletadas amostras desses vasos (100 g de solo vaso⁻¹), para ser realizada a contagem indireta (CI) de esporos de FMA do 1º ciclo, as plantas já secas foram cortadas com uma tesoura estéril rente ao solo (Figura 4), e a amostra de solo foi coletada com o auxílio de um trado, também estéril, com o mínimo de revolvimento.

Figura 4- Vista da cultura-armadilha em casa de vegetação com sorgo granífero (*Sorghum bicolor* L. Moench) e amendoim (*Arachis hypogea* L.) ao final do 1º ciclo (3 meses).



Extração de glomerosporos

Esporos de FMA foram extraídos do solo pelo método de peneiramento em via úmida (GERDEMANN & NICOLSON, 1963) sendo utilizados 100 g, seguido de centrifugações em água e sacarose 50% (JENKINS, 1964). Para este procedimento, foi utilizado um Becker de 2000 mL contendo o mesmo valor (volume) de água, para o qual a amostra de solo foi transferida, e homogeneizada com o auxílio de um bastão de vidro e depois de alguns minutos o sobrenadante foi transferido, ou seja, passado por três peneiras sobrepostas de 1,68 mm; 1,50 mm e 0,037 mm. O material retido nas peneiras foi repassado para tubos para ser submetido à centrifugação em água por 3 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o material decantado nos tubos passados novamente em centrífuga, sendo que agora com sacarose à 50% e por 1 minuto. Em seguida o sobrenadante foi transferido

para peneira de malha mais fina (0,037) mm para ser “lavado” com água para retirada do excesso de sacarose, para esta não danificar os esporos. Este material seguiu para placas canaletadas para ser feita a contagem dos glomerosporos com o auxílio de estereomicroscópio.

Experimento II- Número Mais Provável (NMP) de propágulos infectivos de FMA e Glomalina

Para avaliação do NMP de propágulos infectivos de FMA no Luvisso solo Háplico foi utilizada a técnica descrita por Feldman & Idczak (1994). Que determina a infectividade por diferentes diluições de um inóculo e calcula o número de propágulos na amostra original por médias matemáticas.

Foram montados 20 vasos (copos descartáveis de 250 mL cada), estes vasos foram divididos em quatro diluições, cada qual com cinco repetições: 1) Diluição 0, continha apenas o solo; 2) Diluição 1:10, esta continha 1 parte do inóculo (solo) e 9 partes de areia lavada e autoclavada (diluyente); 3) Diluição 1:100, 1 parte da mistura (1:10) misturada com 9 partes de areia lavada autoclavada; 4) Diluição 1:1000, continha 1 parte da mistura (1:100) mais 9 partes da areia lavada autoclavada. Cada vaso recebeu 200 g de substrato (solo + areia ou mistura + areia, de acordo com suas respectivas diluições).

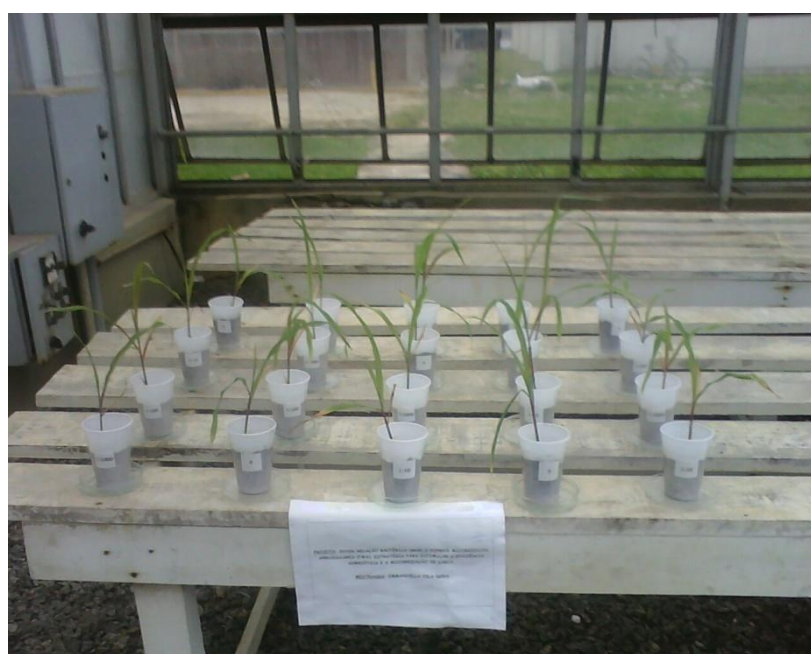
Como planta hospedeira foi utilizada o milho (*Zea mays* L.). Duas sementes de milho, pré-germinadas em bandejas contendo areia lavada e autoclavada (esterelizada) (a 121 °C por 1 hora, por dois dias consecutivos), foram transplantadas para os vasos.

Figura 5- Vista geral do NMP em casa de vegetação com milho (*Zea mays* L.) no dia em que foi lançado o experimento.



Após os primeiros 10 dias de experimento foi realizado o desbaste deixando-se uma planta por vaso (Figura 6) e foram aplicados 20 mL da solução nutritiva de Hoagland & Arnon modificada (JARSTFER & SYLVIA, 1992), isenta de P. A solução nutritiva foi aplicada semanalmente até o término do experimento. A manutenção com água foi a partir da rega realizada com água destilada. Estes vasos ficaram em casa de vegetação por um período de 30 dias.

Figura 6- Vista geral do NMP em casa de vegetação com milho (*Zea mays* L.) após desbaste, aos 10 dias de experimento.



No final do período (Figura 7), as plantas foram colhidas e as raízes separadas, lavadas, diafanizadas com KOH (10%) e coradas com azul de Trypan (0,05%) em lactoglicerol (Figura 8) (PHILLIPS & HAYMAN, 1970). Para determinar o NMP foram atribuídos os sinais (+) para presença e (-) para ausência de estruturas típicas de FMA nas raízes (Figura 9) observadas em estereomicroscópio e estimado pela tabela de Cochran (FELDMAN & IDCZAK, 1994), e os resultados expressos em números de propágulos por cm^{-3} substrato. Quando necessário, fez-se o uso do microscópio para certificar-se da colonização micorrízica (Figura 10).

Figura 7- Vista geral do experimento NMP em casa de vegetação com milho (*Zea mays* L.) aos 30 dias de cultivo.



Figura 8- Raízes de milho (*Zea mays* L.) coradas com azul de Trypan (0,05%) em lactoglicerol.

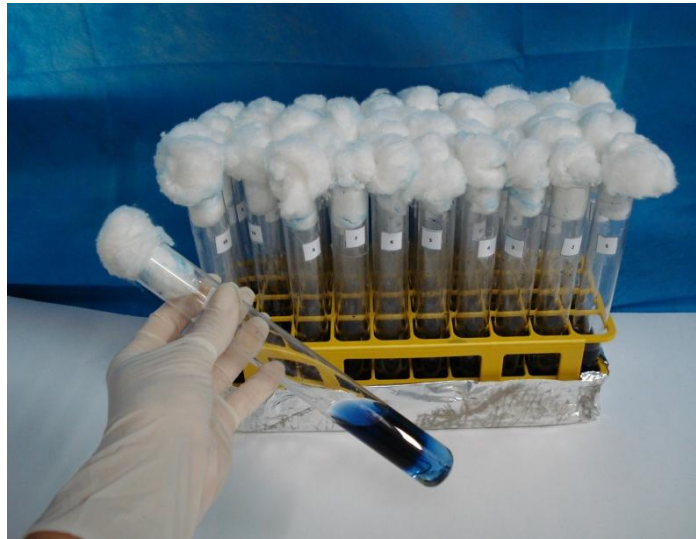
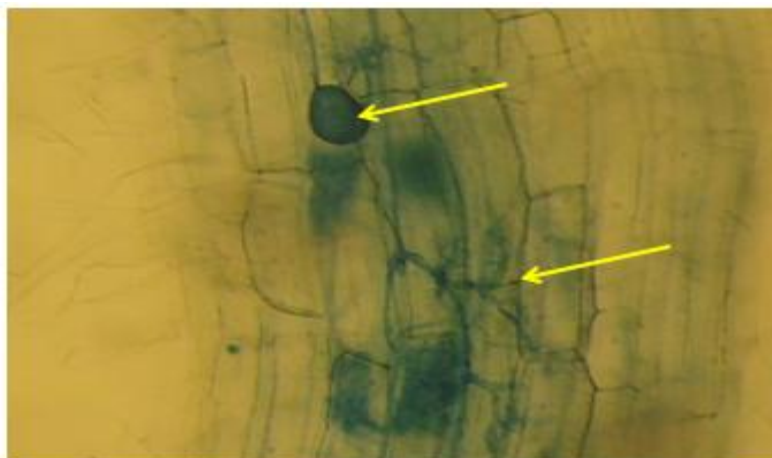


Figura 9- Lâmina referente à diluição 1:10 (tubo de nº 10, repetição 5) do NMP contendo fragmentos de aproximadamente 1 cm de raízes de milho (*Zea mays* L.) coradas com azul de Trypan (0,05%) em lactoglicerol.



Figura 10- Imagens visualizadas em microscópio (400x) referente à lâmina de diluição 1:10 (tubo de nº 10, repetição 5) de raízes de milho (*Zea mays* L.) coradas com azul de Trypan (0,05%) em lactoglicerol, apresentando hifas, vesículas e arbúsculos.



Quantificação de proteínas do solo relacionadas à glomalina

As análises foram realizadas no Laboratório de Micorriza, na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Foram quantificados os teores das frações facilmente extraível e total de proteínas do solo relacionadas à glomalina, (PSRGFE) e (PSRGT), respectivamente, pelo método de Wright & Upadhyaya (1998).

Em um tubo rosqueável pesou-se 0,25 g de solo e a este foi adicionado 2 mL de citrato de sódio (20mM; pH 7,0), para extrair a PSRGFE. O solo então foi autoclavado por 30 minutos a 121 °C, e em seguida realizada centrifugação a 10.000 g, durante 5 minutos. Para a extração da PSRGT, ao mesmo solo foi adicionado 2 mL de citrato de sódio (50mM; pH 8,0) e a autoclavagem com duração de 1 hora a 121 °C. Ciclos de autoclavagem de 1 hora foram feitos até que o extrato perdesse a cor telha, ou melhor, marrom-avermelhada, característica da presença de glomalina. O sobrenadante resultante do ciclo de extração da GT foi também centrifugado a 10.000 g/ 5 minutos.

Após a extração da glomalina, a dosagem foi feita por colorimetria de acordo com Bradford (1976), para quantificar o teor de glomalina (mg g de solo⁻¹). Dessa forma, em um tubo de ensaio foi adicionado 50 µL do extrato,

juntamente com 2,5 mL do corante (azul de comassie brilhante G-250), o material foi incubado no escuro por 5 minutos e a leitura foi feita em um espectrofotômetro a 595 nm. Este método foi utilizado tanto para a quantificação dos teores de PSRGFE quanto para os de PSRGT, tendo como curva-padrão albumina soro bovina (BSA). Os dados foram expressos em mg de glomalina g⁻¹ após correção dos volumes de extração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de glomerosporos do solo de Sertânia (Luvisolo Háplico) apresentou média de 961,3 glomerosporos 100 g solo⁻¹ (Tabela 3) na contagem direta (CD). E uma média de 517,4 glomerosporos 100 g solo⁻¹ (Tabela 4) na contagem indireta (CI), ou seja, na multiplicação (cultura-armadilha).

Como as amostras da CD foram coletadas próximas às raízes das plantas da área em estudo, isso deve ter influenciado este valor superior ao da CI, já que a rizosfera é o local onde a maior quantidade de microrganismos se encontra. Outro fator deve ter sido a própria adaptação dos microrganismos a uma nova situação, vasos em casa de vegetação, habitat completamente diferente do seu no solo como um todo. Isto provavelmente deve ter sido crucial, inibindo a esporulação de determinadas espécies.

Tabela 3. Número de glomerosporos, 100 g solo⁻¹, em área com vegetação nativa no município de Sertânia, PE a partir da contagem direta (CD).

Ponto	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº Glomerosporos	973	489	1.988	586	1.397	1.191	830	645	622	892

Tabela 4. Número de glomerosporos, 100 g solo⁻¹, em área com vegetação nativa no município de Sertânia, PE a partir da contagem indireta (CI).

Ponto	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº Glomerosporos	215	699	473	227	1.360	476	425	153	679	467

Quando comparado à contagem direta do presente estudo, Nobre et al. (2010), em solos submetidos à sistemas em aléias com leguminosas, no

Maranhão, obtiveram em seus resultados a maior densidade de glomerosporos (200 glomerosporos 100 g solo⁻¹) na rizosfera de leucena e sombreiro. Silva et al. (2007) verificaram que o número de glomerosporos, em solos com cultivo de sabiá ou leucena em municípios do estado de Pernambuco, variou de 69 a 437 glomerosporos por 50 g de solo em Serra Talhada com plantio de sabiá e em Caruaru com leucena, respectivamente. Souza et al. (2003) trabalhando em área de caatinga, observaram variação de 34 a 860 esporos por 100 g de solo. Oliveira et al. (2009) estudando solo de área de mineração de dunas de restingas revegetadas no litoral da Paraíba observou uma densidade de 50 glomerosporos 50 g solo⁻¹, número este considerado baixo quando comparado ao do presente estudo, ou comparado a outros trabalhos em área nativa como citado anteriormente. Silva et al. (2001) verificaram, em áreas de caatinga nativa e degradadas por mineração, um nível de esporos sempre inferior a 160/100 g de solo. De acordo com esses dados é possível sugerir que, os trabalhos com áreas de solos com vegetação nativa preservada, os quais apresentam sua micro, meso e macrofauna intactas, apresentam valores elevados de glomerosporos em relação aos que tiveram seus solos agredidos, como os de mineração, que apresentaram valores muito inferiores. Estes valores apenas comprovam o quanto um solo pode ser prejudicado com o seu uso inconsequente, e que este pode vir a ser exaurido com o uso indiscriminado.

O NMP de propágulos infectivos de FMA encontrados neste estudo (23 propágulos cm⁻³) (Tabela 5) foi intermediário aos valores encontrados por Silva et al. (2001), que foi de 0,00 a 35,92 na estação seca e de 1,10 a 27,22 na estação chuvosa. De acordo com estes autores, o número de glomerosporos no solo foi sempre superior ao número de propágulos infectivos, a não ser para o solo impactado pela ação da mineração de cobre (bacia de rejeito), durante a época chuvosa. Isso pode ter ocorrido por serem os esporos estruturas mais resistentes que outros tipos de propágulos, como hifas e vesículas, podendo permanecer no solo por mais tempo (SILVA et al., 2001). Também é possível que esporos inviáveis tenham sido contados; além disso, algumas espécies de FMA apresentam dormência e nesse caso não são detectadas pela técnica do NMP (SILVA et al., 2001). O que possivelmente ocorreu no presente estudo, à presença de estruturas mais resistentes como os esporos, ou que os mesmos estivessem em estado de dormência ou inviáveis.

Sousa (2009), avaliando as relações entre a diversidade de sistemas de uso da terra e as comunidades de FMA no semiárido paraibano concluiu que a presença de árvores favoreceu a esporulação, a colonização micorrízica e o número de propágulos infectivos de FMA nos sistemas de uso da terra. O NMP encontrado por Sousa (2009) foi elevado em relação ao encontrado no presente estudo, variou de 39 propágulos cm^{-3} , tendo como sistema de uso da terra a palma sem árvores, a 540 propágulos cm^{-3} , na presença de capim buffel com árvores. Segundo Ganesan & Veeralkshmi (2006) esse valor para o capim buffel pode ter sido justificado, pelo fato do mesmo ser considerado uma boa planta hospedeira para a multiplicação de, por exemplo, *Glomus fasciculatum*, devido ao seu rápido crescimento e abundante sistema radicular.

Gattai et al. (2011), trabalhando com solos da região semiárida do Nordeste do Brasil contaminados por chumbo, verificaram que independentemente do período, seja seco ou chuvoso, o NMP de propágulos infectivos foi drasticamente reduzido, de 140 no período seco e 350 no período chuvoso para 12 e 40, respectivamente, devido ao excesso de chumbo (270 mg kg^{-1}), em relação ao solo não contaminado.

Tabela 5. Número mais provável (NMP) de propágulos infectivos de FMA e quantificação do teor de proteínas do solo relacionadas à glomalina facilmente extraível (PSRGFE) e proteínas do solo relacionadas à glomalina total (PSRGT) em área com vegetação nativa no município de Sertânia, PE.

Solo	NMP	PSRGFE	PSRGT
	Propágulos cm^{-3}	----- mg g solo^{-1} -----	
Luvissolo Háptico	23	0,46	0,26

Já em relação às frações de glomalina, as proteínas do solo relacionadas à glomalina facilmente extraível (PSRGFE) e as proteínas do solo relacionadas à glomalina total (PSRGT) ficaram em torno de 0,46 e 0,26 mg g solo^{-1} , respectivamente (Tabela 5).

Sousa et al. (2011), trabalhando com Luvissolo da região semiárida paraibana sob vegetação de caatinga, utilizado como pasto, observou que os maiores teores de glomalina (0,97 mg g solo^{-1}) são possivelmente explicados pelo pH de 6,08. Já que os fungos tendem a predominar em solos ácidos, pois

em solos alcalinos existe maior concorrência com bactérias e outros organismos (BRADY, 1990).

Sousa (2009) verificou que as relações entre a diversidade de sistemas de uso da terra e as comunidades de fungos micorrízicos arbusculares no semiárido paraibano, os maiores teores de PSRG foram registrados no sistema de produção de palma, ficando em torno de $1,14 \text{ mg g solo}^{-1}$, na qual as plantas também apresentaram maior percentual de colonização micorrízica, sugerindo que grandes quantidades de fotossintatos estavam sendo alocados para os FMA pelas plantas, o que possivelmente estimulou a produção desta proteína.

Mergulhão (2006) trabalhando com rejeito e solo de mineração de gesso do semiárido de Pernambuco, Araripe, encontrou valores de $0,01 \text{ mg g solo}^{-1}$ no rejeito, a $0,9 \text{ mg g solo}^{-1}$, na caatinga preservada para proteína facilmente extraível, e valores de $2,8 \text{ mg g solo}^{-1}$ no rejeito, a $4,3 \text{ mg g solo}^{-1}$ na caatinga preservada para teores de proteína total.

Ainda são poucos e dispersos os dados de teores de proteína total e proteína facilmente extraível na pesquisa brasileira e comumente constituem dados complementares a outros, como C-microbiano, C-orgânico do solo, agregação, diversidade, esporos e infectividade de FMA (PURIN & FILHO, 2010).

Os resultados mostram que, as amostras do solo Luvisolo Háptico apresentam atividade micorrízica com importante número de glomerosporos e propágulos de FMA. Estudos de ocorrência e testes de eficiência com FMA são necessários para ampliar o conhecimento sobre a diversidade e o potencial de uso desses fungos no semiárido pernambucano.

CONCLUSÕES

- As amostras do solo Luvisolo Háptico apresentaram atividade micorrízica com importante número de glomerosporos e propágulos de FMA.
- O NMP de propágulos infectivos de FMA encontrados no município de Sertânia foi de $23 \text{ propágulos cm}^{-3}$, representado como intermediário.

- As proteínas do solo relacionadas à glomalina facilmente extraível (PSRGFE) e as proteínas do solo relacionadas à glomalina total (PSRGT) ficaram em torno de 0,46 e 0,26 mg g solo⁻¹, respectivamente, o qual corresponde a áreas sem estresse abiótico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F. A.; FONSECA, H. M. A. C. Fungos micorrízicos arbusculares: Muito além da nutrição. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição Mineral de Plantas**. SBCS, Viçosa, 432 p., 2006.

BONFANTE, P. & ANCA, I.A. Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions. **Annu. Rev. Microbiol.**, 63:363–83, 2009.

BURITY, H. A. et al. Efetividade da inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares em mudas de sabiá submetidas a diferentes níveis de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 4, p. 801-807, abr. 2000.

BRADY, N. C. **The nature and properties of soils**. 10. ed. New York: Macmillan Publishing, p. 227-230, 1990.

COLLOZZI-FILHO, A.; SIQUEIRA, J. O.; SAGGIN JÚNIOR, O. J.; GUIMARÃES, P. T. G.; OLIVEIRA, E. Efetividade de diferentes fungos micorrízicos arbusculares na formação de mudas, crescimento pós-transplante e produção do cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 9, p. 1397-1406, 1994.

CORNIS, D. Glomalin, hiding place for a third of the world's stored soil carbon. **Agricultural Research**, Washington, v. 50, n. 9, p. 4-7, 2002.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. Rio de Janeiro, Centro Nacional de Pesquisa de Solos, p. 212, 1997.

EMBRAPA Solos, **Zoneamento Agroecológico de Pernambuco**. Disponível em: <http://www.uep.cnps.embrapa.br/zape/>. Acesso em: 25 jan. 2011.

EMBRAPA Monitoramento por satélite, **Mapeamento e Estimativa da Área Urbanizada do Brasil.** Disponível em: <http://www.urbanizacao.cnpm.embrapa.br/conteudo/uf/pe.html>. Acesso em: 27 out. 2011.

FELDMANN, F. & IDCZAK, E. Inoculum production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for use in tropical nurseries. *In*: J. R. Norris, D. J. Read & A. K. Varma (eds.). **Techniques of Mycorrhizal Research. Methods in Microbiology.** Academic Press, London, pp. 799-817, 1994.

FREITAS, S. S. Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas *In*: **Microbiota do solo e qualidade ambiental.** (Ed.) Adriana Parada Dias da Silveira; Sueli dos Santos Freitas. Campinas: Instituto Agronômico, p. 10-27, 2007.

GANESAN, V. & VEERALAKSHMI, M. Assessment of suitable host for the mass multiplication of arbuscular mycorrhizal *Glomus fasciculatum*. *In*: JAYABALAN, N. **Plant Biotechnology,** Kul Bhushan Nangia APH Publishing Corporation: New Delhi, p. 3003-3016, 2006.

GATTAI, G. S.; PEREIRA, S. V.; COSTA, C. M. C.; LIMA, C. E. P.; MAIA, L. C. Microbial activity, arbuscular mycorrhizal fungi and inoculation of woody plants in lead contaminated soil. **Brazilian Journal of Microbiology,** v. 42, p. 859-867 2011.

GERDEMANN, J. W. Vesicular-arbuscular micorrhiza. *In*: TORREY, J. G.; CLARKSON, D. T. **The Development and Function of Roots** - New York: Academic Press, p. 573-579, 1975.

GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transaction of the British Mycological Society,** v. 46, p. 235-244, 1963.

GOMIDE, P. H. O.; SANTOS, J. G. D. dos; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S. Diversidade e função de fungos micorrízicos arbusculares em sucessão de

espécies hospedeiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 11, p. 1483-1490, 2009.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M. C.; CARRILLO-GONZÁLEZ, R.; WRIGHT, S. F.; NICHOLS, K. A. The role of glomalina, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. **Environmental Pollution**, v. 130, p. 317-323, 2004.

HEIDJEN, M. G. A.; KLIRONOMOS, J. N.; URSIC, M.; MOUTOGLIS, P.; STREITWOLFENGEL, R.; BOLLER, T.; WEMKEN, A.; SANDERS, I. R. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. **Nature**, London, v. 396, p. 69-72, 1998.

INVAM. **International culture collection of (vesicular) arbuscular mycorrhizal fungi**. Disponível em: <<http://invam.caf.wvu.edu/>>.

JARSTFER, A. G.; SYLVIA, D. M. Inoculum production and inoculation strategies for vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. In: Blaine Meeting Jr., F. (ed.). **Soil Microbial Ecology**. Application in Agricultural and Environmental Management. Marcel Dekker, New York. P. 349-369, 1992.

JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, v. 48, p. 692, 1964.

LINDERMAN, R. G. Vesicular arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. In: BETHELENFALVAY, G. J.; LINDERMAN, R. G. (Ed.). **Mycorrhizae in sustainable agriculture**. Madison: American Society of Agronomy, p. 45-70, 1992. (ASA. Special Publication 54).

LINDERMAN, R. G. Effects of mycorrhizas on plant tolerance to diseases. In: KAPULNIK, Y.; DOUDS, D. D. J. (Ed.). **Arbuscular mycorrhizas: physiology and function**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 345-365, 2000.

MAIA, L. C. & CAVALCANTI, U. M. T. **Respostas fisiológicas de plantas micorrizadas**. Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, p. 405-415, 2005.

MAIA, L. C. & GIBERTONI, T. B. Fungos registrados no semi-árido nordestino. In: E. V. S. B. Sampaio; A. M. Giuliatti; J. Virgínio & C. F. L. Gamarra-Hojas. (Ed.). **Vegetação e Flora da Caatinga**. Recife, v. 1, p. 163-176, 2002.

MAIA, L. C. & TRUFEM, S. F. B. Fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em solos cultivados no Estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** 13: 89-95, 1990.

MENGE, J. A.; DAVIS, R. M.; JOHNSON, E. L. V.; ZENTMYER, G. A. **Mycorrhizal fungi increase growth and reduce transplant injury in avocado**. California Agriculture, Berkeley, v. 4, p. 6-7, 1978a.

MERGULHÃO, A. C. do E. S. **Aspectos ecológicos e moleculares de fungos micorrízicos arbusculares**. 2006. 152p. Tese – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

MERGULHÃO, A. C. do E. S.; LYRA, M. do C. C. P. de; SILVA, M. L. R. B. da; OLIVEIRA, J. de P. Arbuscular mycorrhizal fungi in degraded areas. In: ARAÚJO, A. S. F. de; FIGUEIREDO, M. do V. B. **Microbial Ecology of Tropical Soils**. Nova Science Publishers. p. 249-263, 2011.

MERGULHÃO, A. C. do E. S.; BURITY, H. A.; MAIA, L. C.; SILVA, F. S. B. da. Glomalina: a glicoproteína dos fungos micorrízicos. Parte I – FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO N₂. In: FIGUEIREDO, M. do V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E. de R. e S. **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura**. 1.ed. Guaíba, Agrolivros. p. 17-41, 2008.

MIRANDA, J. C. C. de. **Cerrado: micorriza arbuscular: ocorrência e manejo**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 15-18, 2008. MIRANDA, J. C. C.; HARRIS, P. J. Effects of soil phosphorus on spore germination and hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Oxford, v. 128, p. 103-108, 1994a.

MOREIRA, F. M. S. Nitrogen-fixing Leguminosae-nodulating bacteria. In: Moreira, F. M. S, Siqueira, J. O., Brussaard, L. **Soil biodiversity in Amazonian and other brazilian ecosystems**. Wallingford:CAB International Publishing, p. 237-270, 2006.

OEHL, F.; SIEVERDING, E.; PALENZUELA, J.; INEICHEN, K.; SILVA, G. A. da. Advances in *Glomeromycota* taxonomy and classification. **IMA Fungos**, v. 2, p. 191-199, 2011.

PARNISKE, M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 6, p. 763-775, 2008.

PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesiculararbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, p. 158-161, 1970.

PURIN, S. & FILHO, O. K. Glomalina: nova abordagem para entendermos a biologia dos fungos micorrízicos arbusculares. In: SIQUEIRA, J. O.; SOUZA, F. A. de; CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M. **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: UFLA. p. 503-524, 2010.

RILLIG, M. C.; MUMMEY, D. L. Mycorrhizas and soil structure. **New Phytologist**, Oxford, v. 171, p. 41-53, 2006.

SIEVERDING, E. **Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems**. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit, Eschborn. 1991.

SILVA, G. A. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi in a semiarid copper mining area in Brazil. **Mycorrhiza**, v.15, p.47-53, 2005.

SILVA, G. A. et al. Potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares oriundos de área de caatinga nativa e degradada por mineração, no Estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.24, p.135-143, 2001.

SOUSA, C. da S.; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. de S. B.; LIMA, F. de S. Influências da temperatura de armazenamento e de extratores na determinação de glomalina em solos paraibanos. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 837-841, 2011.

SOUSA, C. da S. **Diversidade e atividade de fungos micorrízicos arbusculares em agroecossistemas do semiárido paraibano**. 2009. 136p. Tese (Doutorado em Tecnologias Energéticas e Nucleares – Aplicação de Radioisótopos na Agricultura e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

TORO, M. & NICHOLS, K. Glomalin as an indicator of mycorrhizae in tropical agroecosystems. In: ARAZJO, A. S. F. & FIGUEIREDO, M. V. B. **Microbial ecology of tropical soils**. New York, Nova Science Publishers, Inc., p. 207-247, 2011.

VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria**. London: International Biological Programme, 1970. 164p. (IBP. Handbook, 15).

WANG, B.; QIU, Y. L. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 16, p. 299-363, 2006.

WRIGHT, S. F. & UPADHYAYA, A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**. 198: 97-107, 1998.

WRIGHT, S. F.; GREEN, V. S.; CAVIGELLI, M. A. Glomalin in aggregate size classes from three different farming systems. **Soil & Tillage Research**, v. 94, p. 546-549, 2007.

CAPÍTULO II

CO-INOCULAÇÃO MHB X *Burkholderia sabiae* EM SABIÁ NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

CO-INOCULAÇÃO MHB X *Burkholderia sabiae* EM SABIÁ NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

RESUMO

A sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth) é uma leguminosa arbórea, que ocorre naturalmente na região do Nordeste brasileiro, especialmente em áreas de Caatinga e sua utilização é uma estratégia para obtenção de nitrogênio e produção de alimentos, e a associação com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) é uma importante e eficiente alternativa para a recuperação de áreas degradadas. O estabelecimento das simbioses micorrízicas pode ser positivamente influenciado por certos isolados de bactérias, efeito este exibido pela mycorrhiza helper bacteria (MHB). Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram verificar a viabilidade da co-inoculação bactérias (MHB) e FMA em sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth) visando obter combinações e compatibilidade de pares simbióticos, assim como avaliar a formação micorrízica (colonização de raiz). O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Sede do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), em vasos com o solo Luvisolo Háplico (8 kg vaso⁻¹) com pH 6,0. Na semeadura, foi efetuada inoculação com *Burkholderia sabiae* (BR 3405) e co-inoculação com BR3405 + MHB e cada semente foi inoculada com 2 mL do meio específico para cada bactéria das MHB, assim como para BR3405 contendo 10⁸ UFC mL⁻¹. Na inoculação com a mistura do FMA, foram utilizados 4 g vaso⁻¹ em forma de propágulo, contendo aproximadamente 670 esporos. A colheita foi realizada 110 dias após plantio (DAP) e foram avaliadas as seguintes variáveis: massa seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR), relação MSR/MSPA, altura de planta (AP) nos períodos de 45, 90 e 110 dias, comprimento da raiz (CR), N total acumulado na MSPA (Nac), eficiência das estirpes (E) e colonização micorrízica. O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados, com arranjo fatorial 9 x 2 mais uma testemunha absoluta (TA) – sem inoculação; estirpes de MHB e um tratamento controle inoculado apenas com *Burkholderia sabiae* com e sem FMA (mistura de FMA) com 3 blocos. Os resultados dos experimentos mostram que a colonização dos FMA em conjunto com as bactérias foi positiva, como no caso do CR, os tratamentos com BR

3405 + *Azospirillum amazonenses* (Y2) e BR 3405 + *Herbaspirillum seropedicae* (Z67) apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) em relação ao fator com e sem FMA. Confirmando deste modo que, na presença das bactérias MHB houve um aumento no comprimento do sistema radicular das plantas de sabiá. A eficiência das estirpes obteve os melhores resultados quando as bactérias estavam em presença de FMA e o tratamento BR 3405 + *Paenibacillus brasolensis* (24) + FMA foi o que obteve melhor resposta, destacando-se em relação aos demais. Os tratamentos que receberam os FMA foram superiores em relação aos demais nas variáveis MSPA, MSR, e Nac, chegando a apresentar uma média em torno de 84% de colonização radicular.

Palavras chave: Mycorrhiza helper bacteria, FMA, *Paenibacillus brasiliensis*, nodulação, simbiose, colonização radicular.

MHB X *Burkholderia sabiae* CO-INOCULATION IN SABIÁ IN THE PRESENCE AND ABSENCE OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI

ABSTRACT

Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth) is a leguminous tree, which occurs naturally in the Northeast region of Brazil, especially in Caatinga areas and its use is a strategy for obtaining nitrogen and food production, and the association with mycorrhizal fungi (AMF) is an important and efficient alternative to recovery of degraded areas. The establishment of mycorrhizal symbioses can be positively influenced by certain strains of bacteria, such effect exhibited by the Mycorrhiza helper bacteria (MHB). In this context, the objectives were to verify the feasibility of co-inoculating bacteria (MHB) and AMF in sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth) aiming at obtaining combinations and compatibility of symbiotic pairs, as well as assessing the mycorrhizal formation (root colonization). The experiment was conducted in greenhouse of the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA) in pots with Haplic Luvisol soil (8 kg pot⁻¹) at pH 6.0. On seeding, inoculation with *Burkholderia sabiae* (BR 3405) and co-inoculation with BR3405 + MHB were performed and each seed was inoculated with 2 mL of specific medium for each MHB bacteria and for the BR3405 containing 10⁸ CFU mL⁻¹. In the inoculation with AMF mixture was used 4 g pot⁻¹ in the form of propagule containing approximately 670 spores. Plants were harvested at 110 days after planting (DAP) and the following variables were evaluated: shoot dry mass (SDM), root (RDM), RDM/SDM ratio, plant height (PH) on periods of 45, 90 and 110 days, root length (RL), total N accumulated in SDM (Nat), strains efficiency (E) and mycorrhizal colonization. The experimental design was randomized blocks, with 9 x 2 factorial arrangement plus an absolute control (AC) - without inoculation; MHB strains and one control treatment inoculated only with *Burkholderia sabiae* with and without AMF (AMF mixture) with 3 blocks. The experimental results show that AMF colonization combined with bacteria was positive, as in the case of RL, treatments with BR 3405 + *Azospirillum amazonenses* (Y2) and BR 3405 + *Herbaspirillum seropedicae* (Z67) showed significant difference by the Tukey test ($p < 0.05$) compared to the factor with and without AMF. Thereby ensuring that, in the presence of MHB bacteria there was increase in root length of sabiá plants. Strains efficiency showed better results when bacteria were in the

presence of AMF and the treatment BR 3405 + *Paenibacillus brasilensis* (24) + AMF showed the best response, especially in relation to the others. Treatments that received AMF were higher compared to the others on the variables SDM, RDM, E, Nat, coming to present on average 84% of root colonization.

Keywords: Mycorrhiza helper bacteria, AMF, *Paenibacillus brasilensis*, nodulation, symbiosis, root colonization.

INTRODUÇÃO

O nitrogênio é o elemento responsável pelas elevadas produções na agricultura tropical, embora este se apresente, em sua maioria, na forma gasosa (N_2) que não é assimilável pelas plantas. Porém, certas bactérias, chamadas de diazotróficas ou fixadoras de N_2 , são capazes de transformar o N_2 da atmosfera em NH_3 , que posteriormente é transformado em aminoácidos, os quais são assimilados pelas plantas leguminosas (SANTOS et al., 2008; DÖBEREINER, s. d.). O processo em que as leguminosas estabelecem relações com bactérias do solo, coletivamente conhecidas como rizóbios, é que damos o nome de fixação simbiótica de nitrogênio (CASTRO & FERREIRA, 2011; SANTOS et al., 2008; DÖBEREINER, s. d.).

A sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth) é uma leguminosa arbórea, que ocorre naturalmente na região do Nordeste brasileiro, especialmente em áreas de caatinga (FIGUEIRÔA et al., 2005). Sua utilização é uma estratégia para obtenção de nitrogênio e produção de alimentos, e a associação com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) é uma importante e eficiente alternativa para a recuperação de áreas degradadas, além de tornar as plantas mais resistentes e aptas a colonizar o ambiente (FRANCO et al., 2000).

Pesquisas iniciadas na década de 1990 revelaram uma ampla gama de microrganismos, incluindo de diversas bactérias, com predominância de espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Bacillus* (DE BOER et al., 2005). Quanto aos *Streptomyces* (actinobactérias), estes foram associados a fungos ectomicorrízicos e foram ditos como moduladores de simbioses das plantas (SCHREY & TARKKA, 2008). Estes gêneros de bactérias fazem parte do grupo de MHB (Micorrhiza Helper Bacteria), grupo este composto por tantos outros gêneros (FREY-KLETT et al., 2007). Garbaye (1994) as define como bactérias associadas com raízes e FMA que, seletivamente, promovem o estabelecimento da simbiose com os fungos.

As MHB têm sido identificadas por muitos grupos de bactérias e gêneros tais como: *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* e *Arthrobacter*, o que

demonstra a diversidade de bactérias com uso potencial em processos biotecnológicos (FREY-KLETT et al., 2007).

O resultado, do benefício, destas bactérias MHB pode ser comprovado na germinação de esporos; no crescimento micelial; aumento da ramificação radicular; maior colonização de raiz; redução de estresses do solo, desde seca até contaminação com metais pesados como Pb, Zn e Cd, a partir da desintoxicação de substâncias antagônicas; inibição de competidores e antagonistas (FREY-KLETT et al., 2007; KOZDRÓJ et al., 2007; VIVAS et al., 2006; 2003a; 2003b).

Trabalhos de co-inoculação com MHB têm mostrado resultado positivo já alguns anos Paula et. al. (1992) em estudos com batata doce, tendo como FMA o *Glomus clarum* e como MHB, *Azotobacter diazotrophicus* e *Klebsiella* sp., observaram que o aumento da produção de tubérculos foi altamente correlacionado com a colonização de FMA, mostrando uma alta dependência da batata doce em relação a infecção micorrízica.

Resultados do efeito das MHB, também foi visto por Vivas et al. (2003) com *Glomus mosseae* e *Brevibacillus* sp. em *Trifolium pratense* e Budi et al. (1999) com *Glomus mosseae* e *Panbacillus* sp. em *Sorghum bicolor*.

Lima (2009), trabalhando com caupi, obteve resultados no qual a estirpe de *Paenibacillus brasilensis* (24) foi superior em relação às demais estirpes avaliadas na produção de nitrogênio acumulado na matéria seca da parte aérea, proporcionando uma melhor performance simbiótica.

A nutrição fosfatada é um fator essencial para que haja o estabelecimento da nodulação e fixação de N₂ pelas leguminosas forrageiras, e como os FMA aumentam a absorção de P, este elemento é de grande valor para a melhoria da fixação do N atmosférico, crescimento e efetiva nodulação de planta (GIBSSON, 1976).

Os objetivos deste trabalho foram determinar a viabilidade da co-inoculação entre bactérias (mycorrhiza helper bacteria - MHB) e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth) na presença e ausência de FMA (mistura de fungos) visando obter combinações e compatibilidade de pares simbióticos, assim como avaliar a formação micorrízica.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Sede do Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA em vasos contendo o solo Luvisolo Háplico antigo Bruno não Cálcico (EMBRAPA Solos, s.d.) (8 kg vaso⁻¹) com pH 6,0. O solo foi coletado a uma profundidade de 0-20 cm, na Estação Experimental do IPA de Sertânia – PE, 08° 04' 25" S e 37° 15' 52" W a uma altitude de 558 m (EMBRAPA Monitoramento por Satélite, s.d.). As amostras foram então, peneiradas (2,0 mm de diâmetro), homogêneas e analisadas quanto às características físicas e químicas (Tabela 1 e 2) segundo a metodologia recomendada pela EMBRAPA (1997) no Laboratório de Fertilidade e Física do Solo do IPA.

Tabela 1. Características químicas do Luvisolo Háplico originário de área com vegetação nativa no município de Sertânia, PE.

Área	P	Ca	Mg	K	Na	Al	H	CTC	pH
	mg dm ⁻³	Cmolc dm ⁻³						H ₂ O 1:2,5	
Sertânia – PE	12	3,9	1,95	0,32	0,18	-	3,3	9,6	6,0

Tabela 2. Características físicas do Luvisolo Háplico originário de área com vegetação nativa no município de Sertânia, PE.

Área	Granulometria (%)				Umidade Residual	ds	dp
	Areia Grossa	Areia Fina	Silte	Argila	%	g cm ⁻³	
Sertânia – PE	50	19	21	10	2,0	1,61	2,65

*Densidade do solo (ds), **Densidade da partícula (dp).

O solo foi autoclavado por uma hora, a uma temperatura de 120°C e a uma pressão de 101 KPa, com intervalos de 24 horas, por três dias consecutivos.

A leguminosa utilizada foi à espécie de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.), e as estirpes de β - rizóbio (*Burkholderia sabiae*) (bactéria recomendada pela Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola – RELARE) e de mycorrhiza helper bacteria (MHB) usadas encontram-se listadas na Tabela 3.

Tabela 3. Estirpes de rizóbio e mycorrhiza helper bacteria (MHB).

Bactérias (Espécies)	Identificação Embrapa	Identificação em outras coleções	Procedência
<i>Burkholderia sabiae</i>	BR 3405 (Padrão)	SEMIA 6382	Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia (CNPAB)
<i>Bacillus subtilis</i>	-----	438	Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos (UFPEDA)
<i>Brevibacillus brevis</i>	-----	447	Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos (UFPEDA)
<i>Paenibacillus brasiliensis</i>	-----	24	Instituto de Microbiologia da UFRJ
<i>Streptomyces</i> sp.	-----	S30	Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos (UFPEDA)
<i>Azospirillum amazonense</i>	BR 11140	Y2	Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia (CNPAB)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	BR 11175	Z67	Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia (CNPAB)
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	BR 11281	PAL5	Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia (CNPAB)

Estas estirpes foram purificadas e repicadas em duplicatas em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL dos meios específicos para cada bactéria. E a concentração de bactérias utilizada foi de 10^8 UFC mL⁻¹.

A estirpe de *Burkholderia sabiae* foi repicada em meio YMA (Agar, manitol e extrato de levedura) com o indicador vermelho do congo, segundo Vincent (1970), por 2 dias e, posteriormente, foi repicada em meio líquido YM (Manitol e extrato de levedura) por 48 horas, a uma temperatura de 28 °C, sob uma agitação mecânica de 200 rpm. Já as de *Bacillus subtilis*, *Brevibacillus brevis* e *Paenibacillus brasiliensis* foram repicadas para o meio líquido TSB (Trypticase soy broth), por 24 horas, 24 horas e 48 horas, respectivamente, a 31 °C e 200 rpm.

Quanto à estirpe de *Streptomyces* sp. esta foi crescida em meio líquido AY (Arginina e extrato de levedura) Por um período de 96 horas, a 31 °C e 200 rpm.

As estirpes de *Azospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* ao serem desliofilizadas passaram para meios sólidos específicos, LGI, JNFb e LGI-P, respectivamente, por um

período de 48 horas à 31 °C. Em seguida, as mesmas foram transferidas para os seus respectivos meios específicos, porém, semissólidos, e ao formarem o véu característico do seu crescimento (4 dias) foram armazenadas em tubos de ensaio com meio batata e batata-P (*Gluconacetobacter diazotrophicus*). Para crescimento em meio líquido foi utilizado o meio DYGS, para um menor período de incubação, 48 horas, à 31°C e 200 rpm.

Nas sementes de sabiá, provenientes da Flora Tietê, foi realizada a quebra de dormência a uma temperatura de 80°C por 1 segundo, por imersão em água, retirando-a da água e repetindo-se essa operação por trinta vezes (recomendada pelo Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais- IPEF) para romper a impermeabilidade do tegumento. Em seguida, foi efetuada a desinfestação por meio de imersão em álcool a 70%, por 30 segundos, em seguida por 1 minuto em hipoclorito de sódio a 2%, e posteriormente lavadas com água destilada, autoclavada, por sete vezes (VINCENT, 1970).

Os grupos de glomerosporos foram montados em lâminas de acordo com características morfológicas (cor, forma e tamanho) e agrupados os glomerosporos, no qual parte deles (1/2 lâmina) recebeu o reagente PVLG (álcool-polivinílico em lactoglicerol) e a outra parte (1/2 restante da lâmina) receberam o reagente Melzer + PVGL (1:1). Os mesmos foram observados ao microscópio (400x).

Para identificação das espécies utilizadas na mistura de FMA, foram consultados Schenck & Pérez (1990), a home-page da International Culture Collection for Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM – <http://invam.caf.wvu.edu>) e publicações com descrição de novas espécies.

No plantio foram utilizadas oito sementes por vaso, e após a germinação foi efetuado o desbaste deixando uma planta por vaso. Na semeadura, cada semente foi inoculada com 2 mL do meio específico para cada bactéria das MHB, assim como para *Burkholderia sabiae* contendo 10^8 UFC mL⁻¹. Na inoculação com uma mistura de FMA (*Glomus clarum*, *Glomus etunicatum*, *Gigaspora margarita*, *Scutelospora* sp. *Acaulospora* sp.) foram utilizados 4 g vaso⁻¹ em forma de propágulo, contendo aproximadamente 670 esporos. Durante o desenvolvimento das plantas foi utilizada a solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada conforme Silveira et al. (1998).

A colheita foi realizada 110 dias após o plantio (DAP) e foram avaliados: Massa seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR), relação MSR/MSPA, altura de planta (AP) aos 45, 90 e 110 dias, comprimento da raiz (CR), N total acumulado na MSPA pelo método de Kjeldahl segundo Bremner (1965), eficiência da estirpe (E) segundo Faria & Franco (2002) e colonização micorrízica (CM) pelo método da lâmina (GIOVANETTI & MOSSE, 1980). A parte aérea e as raízes das plantas foram acondicionadas em sacos de papel, deixados em estufa de circulação forçada a 65°C, durante 72 horas, para proceder à avaliação da MSPA e MSR.

O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados, com arranjo fatorial 9 x 2 (uma testemunha absoluta (TA) – sem inoculação; estirpes de MHB e um tratamento controle inoculado apenas com *Burkholderia sabiae* com e sem FMA (coquetel de FMA) com 3 blocos. Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa estatístico SAS 2.0, com níveis de significância de 5% pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela (4) encontram-se os valores relacionados às variáveis de comprimento da raiz, aos 110 dias, (CR); altura de planta aos 45 dias (ALT45); altura de planta aos 90 dias (ALT90) e altura de planta aos 110 dias (ALT110). A mesma apresenta uma entrada dupla devido à interação entre bactérias e fungos terem sido significativas.

Tabela 4. Comprimento da raiz (CR) e altura de planta aos 45, 90 e 110 dias após plantio (DAP) inoculadas com *Burkholderia sabiae* (BR 3405) e co-inoculadas com BR3405 + mycorriza helper bactéria (MHB)^{*} na presença e ausência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em sabiá.

Bactérias Fungo	Controle	BR3405 ¹	BR3405 + Y2 ²	BR3405 + Z67 ³	BR3405 + PAL5 ⁴	BR3405 + 24 ⁵	BR3405 + 438 ⁶	BR3405 + 447 ⁷	BR3405 + S30 ⁸
Comprimento da Raiz (CR) (cm)									
Sem	13,27Ba	22,00ABa	17,00ABb	17,33ABb	20,00ABa	26,33Aa	26,00Aba	28,00Aa	24,00ABa
Com	25,00Aa	25,80Aa	33,33Aa	31,00Aa	25,00Aa	34,67Aa	32,00Aa	30,75Aa	24,66Aa
C.V. (%)	16,45								
Altura de Planta 45 DAP (AP45) (cm)									
Sem	19,60ABb	16,00Ba	21,83ABb	21,23ABb	23,87ABa	31,30ABb	34,00Aa	32,17ABb	20,83ABb
Com	39,67ABa	33,10Ba	40,17ABa	51,67Aa	39,80ABa	49,47ABa	40,33ABa	49,83ABa	52,17Aa
C.V. (%)	16,54								
Altura de Planta 90 DAP (AP90) (cm)									
Sem	25,83Bb	22,75Bb	37,17Bb	34,50Bb	36,50Bb	63,83ABb	86,33Aa	77,50ABb	34,17Bb
Com	118,50Aa	95,17Aa	106,67Aa	127,67Aa	114,67Aa	129,00Aa	107,33Aa	124,50Aa	118,50Aa
C.V. (%)	18,21								
Altura de Planta 110 DAP (AP110) (cm)									
Sem	29,17Bb	24,00Bb	41,00Bb	41,83Bb	41,67Bb	80,17ABb	101,83Aa	96,00Aa	40,33Bb
Com	144,25Aa	124,00Aa	125,83Aa	145,33Aa	136,83Aa	141,17Aa	121,17Aa	140,75Aa	137,33Aa
C.V. (%)	17,07								

¹BR 3405 (*Burkholderia sabiae*); ²Y2: BR 11140 (*Azospirillum amazonense*); ³Z67: BR 11175 (*Herbaspirillum seropedicae*); ⁴PAL5: BR 11281 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*); ⁵24 (*Paenibacillus brasiliensis*); ⁶438 (*Bacillus subtilis*); ⁷447 (*Brevibacillus brevis*); ⁸S30 (*Streptomyces* sp.). Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Em relação ao comprimento de raiz (CR), observa-se na linha horizontal (letras maiúsculas), que as plantas de sabiá na ausência de fungo micorrízico arbuscular (FMA) no tratamento co-inoculado com a *Burkholderia sabiae* (BR 3405) + *Brevibacillus brevis* (447), não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), em relação aos demais tratamentos, mas obteve a maior média inclusive com um ganho de 111% quando comparada à testemunha absoluta (TA). Em relação às bactérias na presença de FMA, pôde-se perceber que as bactérias entre si, não apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), demonstrando desta forma que a presença da inoculação dos FMA, não interferiu nos diferentes tratamentos com as bactérias inoculadas

isoladamente com *Burkholderia sabiae* (BR 3405) e co-inoculadas (BR 3405+MHB (Mycorriza Helper Bacteria)) apresentando respostas semelhantes. Analisando na linha vertical (letras minúsculas), pôde-se observar que apenas os tratamentos com BR 3405 + *Azospirillum amazonense* - BR11140 (Y2) e BR 3405 + *Herbaspirillum seropedicae* - BR 11175 (Z67) apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) em relação ao fator com e sem fungo, ao contrário dos demais tratamentos que independente da presença do fungo, as bactérias inoculadas isoladamente (BR3405) e/ou co-inoculadas (BR3405 + MHB) não apresentaram diferença significativa, inclusive no tratamento com o controle (TA). Porém foi observado, que na presença da co-inoculação houve um aumento no comprimento do sistema radicular das plantas. Segundo Frey-Klett et al., (2007), uma das características importante da MHB é justamente a sua especificidade por FMA, podendo ajudar a aumentar a formação de micorriza, e promover o estabelecimento da simbiose como: estimular a extensão micelial.

Na altura de planta (AP), aos 45 dias após o plantio (DAP), os tratamentos (na horizontal, letra maiúscula) com as bactérias na ausência de FMA, pode-se verificar que as plantas co-inoculadas BR 3405 + *Bacillus subtilis* (438), embora não tendo apresentado diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) em relação às demais bactérias co-inoculadas, houve diferença significativa ($p < 0,05$) no tratamento inoculado isoladamente com a BR 3405. Em relação à presença dos tratamentos com FMA as plantas de sabiá apresentaram respostas semelhantes. Porém, ao se comparar presença e ausência de FMA (na vertical, letra maiúscula), pode-se observar que apenas os tratamentos com BR 3405, BR 3405 + *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL 5) e BR 3405 + *Bacillus subtilis* (438) não apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Aos 90 e 110 dias DAP (letra minúscula na vertical), as plantas de sabiá apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) para os tratamentos inoculados isoladamente (BR3405) e co-inoculados (BR3405+MHB) na presença de FMA, exceto para o tratamento co-inoculado com BR 3405 + *Brevibacillus brevis* (447). Pode-se observar claramente na linha horizontal (letra maiúscula), que as plantas de sabiá inoculadas e co-inoculadas na presença do FMA aos 45 e 110 DAP obtiveram respostas semelhantes, não havendo diferença significativa ($p < 0,05$), apesar das médias superiores dos tratamentos BR 3405 +

Herbaspirillum seropedicae (Z67) e de BR 3405 + *Streptomyces sp.* (S30) (45dias), BR 3405 + *Paenibacillus brasiliensis* (24) e BR3405 + Z67 (90 dias), e BR 3405 + Z67 (110 dias).

Mendes (2010) em estudo, com o objetivo de avaliar o crescimento de Sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) em resposta à inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares, concluiu que a inoculação conjunta de *Glomus clarum* + *Gigaspora margarita* + BR3405 demonstrou melhor performance simbiótica, proporcionando os maiores valores de crescimento em altura para as plantas de Sabiá.

Burity et al. (2000) avaliando o efeito da dupla inoculação (rizóbio + micorriza) em diferentes níveis de P sobre o desenvolvimento de mudas de sabiá, obteve os melhores resultados para altura de planta no tratamento interação rizóbio-micorriza, apresentando um valor de 127%, superior ao tratamento controle.

Considerando que, apenas o fator principal fungo foi significativo ($p < 0,05$), pode-se observar na Tabela (5) que a massa seca da parte aérea (MSPA), o nitrogênio acumulado (Nac), a massa seca da raiz (MSR) e a colonização radicular (CoIR) da sabiá apresentaram médias bastante superiores quando inoculados com FMA, obtendo diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), quando comparados aos tratamentos sem inoculação. Ao contrário da variável relação massa seca da raiz e da parte aérea MSR/MSPA, que não apresentou sua maior média quando inoculado com FMA.

Tabela 5. Massa seca da parte aérea (MSPA), nitrogênio acumulado na MSPA (Nac), massa seca da raiz (MSR), relação massa seca da raiz e da parte aérea (MSR/MSPA) e colonização radicular (CoIR) inoculadas com *Burkholderia sabiae* (BR 3405) e co-inoculadas com BR3405 + micorriza helper bactéria (MHB) na presença e ausência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em sabiá.

FUNGO	MSPA (g vaso ⁻¹)	Nac (mg N vaso ⁻¹)	MSR (g vaso ⁻¹)	MSR/MSPA (g g ⁻¹)	CoIR (%)
Com	7,51A	176,21A	1,33A	0,23B	84,40A
Sem	1,57B	45,23B	0,43B	0,44A	0,00B
C.V. (%)	47,51	43,80	49,52	75,78	26,70

Na coluna, as médias seguidas de mesma letra não diferem entre si no nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Lima et al. (2011), trabalhando com feijão-caupi, com *Glomus etunicatum* associado com diferentes tratamentos, verificaram que a presença dos fungos proporcionou uma maior média para os tratamentos na MSPA do que aqueles inoculados apenas com rizóbios EI-6 isoladamente ou em mistura (BR 3267 + EI-6). Os autores relatam que independentemente do tratamento, na inoculação com *Glomus etunicatum* o caupi foi favorecido em crescimento nas variáveis MSR e Nac, além da MSPA.

Gross et al. (2004), concluíram que a inoculação concomitante de FMAs e rizóbios incrementou a produção de biomassa nas plantas de angico-do-cerrado. Ainda em relação à MSPA, Mergulhão et al. (2001) trabalhando com sabiá em solo argiloso, obteve os melhores resultados para a produção de MSPA, quando as plantas receberam a dupla inoculação rizóbio + FMA (*Glomus etunicatum*) quando comparado ao controle (apenas com rizóbio).

Jesus et al. (2005), acharam valores semelhantes para MSR nos tratamentos com BR 3405 + FMA (rizóbio + FMA) em comparação ao tratamento que recebeu apenas o BR 3405 (rizóbio), em estudo com *Piptadenia gonoacantha* e *Piptadenia paniculata*.

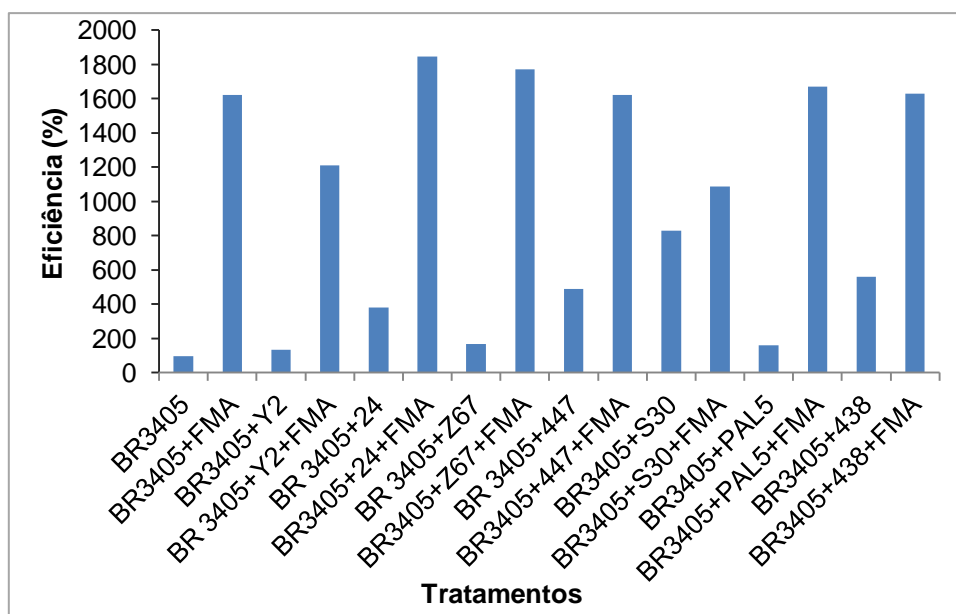
Com relação à colonização radicular, Jesus et al. (2005), obtiveram um resultado que variaram de baixo a alto (16 a 51%), que comparados ao do presente trabalho (84%) foram considerados inferiores.

Burity et al. (2000), concluem que a dupla inoculação (rizóbio + micorriza) apresenta maior área foliar e colonização radicular em relação à inoculação com rizóbio, em mudas de sabiá. Corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho.

A variável eficiência das estirpes (E) (Figura 1) obteve os melhores resultados quando as bactérias estavam em presença de FMA e o tratamento BR 3405 + *Paenibacillus brasilensis* (24) + FMA foi o que obteve melhor resposta, destacando-se sobre os demais. Chegando a apresentar uma média de 1845%, enquanto o mesmo tratamento sem FMA obteve 380%. Mostrando uma interação positiva na presença dos três microrganismos. Jesus et al. (2005), estudando a dependência de micorrizas para a nodulação e crescimento de *Piptadenia gonoacantha* e *Piptadenia paniculata*, leguminosas arbóreas nativas da Região Sudeste do Brasil, obteve resultados também superiores nos tratamentos que receberam o FMA, como o BR 3405 + FMA (497%) em comparação ao sem FMA (75%). Laste et al. (2008), trabalhando

com seleção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para leguminosas herbáceas e arbustivas, concluíram que as estirpes selecionadas com maior eficiência na fixação biológica de nitrogênio em condições estéreis para *Tephrosia adunca* BR 3628 (53%) e BR 5303 (117%) e para *Mimosa xanthocentra* as estirpes BR 3454 (608%) e BR 3523 (494%).

Figura 1- Eficiência* das estirpes em sabiá relacionadas aos tratamentos inoculados com *Burkholderia sabiae* (BR 3405) e co-inoculados com BR3405 + mycorriza helper bactéria (MHB) na presença e ausência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em sabiá.



*Eficiência = 100. (Massa seca da parte aérea (MSPA) de cada estirpe / pela MSPA da testemunha absoluta, sem inoculação (TA)).

De uma maneira geral pode-se verificar no presente experimento (Figura 2) que o tratamento inoculado isoladamente com a *Burkholderia sabeae* (BR3405), não apresentou nódulos nas plantas de sabiá. Sugere-se que a espécie de sábia utilizada (sem acúleos, proveniente de uma mutação genética), possa ter interferido esta resposta nas plantas. Os demais tratamentos co-inoculados com BR3405 + FMA, assim como os co-inoculados com BR3405 + MHB + FMA houve resposta da estirpe BR3405 à nodulação, significando que estes microrganismos MHB e FMA induziram uma nodulação precoce as plantas de sabiá estimulando a infecção e nodulação nas raízes das plantas (Figura 3).

Figura 2- Vista geral do experimento em casa de vegetação com sabiá inoculado isoladamente com BR 3405 e co-inoculados com BR3405 + mycorrhiza helper bacteria (MHB) na presença e ausência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e testemunha absoluta, aos 110 dias após o plantio.



Na interação de FMA com bactérias fixadoras de nitrogênio existe um forte efeito sinérgico relacionado. O processo de FBN requer alta quantidade de energia na forma de ATP, de modo que o adequado fornecimento de P proporcionado pelo FMA favorece esse processo (JESUS et al., 2005), o que acarreta maior e melhor nodulação e funcionamento da nitrogenase (SILVEIRA, 1998).

Da mesma forma a interação entre os rizóbios e bactérias promotoras de crescimento em plantas podem estimular a simbiose e favorecer o processo de FBN podendo aumentar a nodulação e a competitividade do rizóbio pelos múltiplos efeitos positivos na rizosfera das plantas, com o uso desses microrganismos conjuntamente (LI & ALEXANDER (1988)

Figura 3- Raízes de sabiá inoculadas isoladamente com *Burkholderia sabiae* (BR 3405) e co-inoculadas com BR3405 + *Brevibacillus brevis* (447) na presença e ausência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e testemunha absoluta (TA).



Outra resposta poderia ser que este tratamento inoculado isoladamente com a BR3405 no sabiá necessitasse de um período de tempo maior que 110 dias, supondo que pudesse ocorrer neste maior período, uma nodulação tardia, visto que ocorreu resposta à nodulação nos demais tratamentos co-inoculados. Outro fato que poderia ser investigado é a especificidade hospedeira já que esta planta não apresentou acúleos e a não resposta a esta estirpe BR 3405 inoculada isoladamente poderia necessitar de um maior tempo para formação dos nódulos, quando inoculada isoladamente.

A especificidade hospedeira se caracteriza como sendo a capacidade de espécies leguminosas formarem nódulos e fixar nitrogênio com diferentes estirpes de rizóbio isoladas de outras espécies e/ou representa a habilidade de uma estirpe de rizóbio em provocar a nodulação e fixar N₂ quando associada a cultivares ou espécies do hospedeiro específico (DOBEREINER et al., 1971). Os mecanismos envolvidos na simbiose, que determinam a especificidade hospedeira, ainda não estão completamente esclarecidos, contudo se sabe que flavonóides e compostos fenólicos exsudados das raízes ativam ou inibem genes bacterianos da nodulação (PETERS & LONG, 1988). Além destes fatores extremamente importantes e complexos para o acontecimento da simbiose rizóbio-leguminosa, outro de grande importância, é o fato dos microrganismos responsáveis pela FBN em leguminosas não serem provenientes somente das alfa-proteobacteria, mas, também de bactérias do grupo da beta-proteobacteria (descoberto em nódulos isolados de Mimosas) (MOULIN, et al. 2001), Por isso programas de seleção de estirpes de rizóbio para leguminosas se faz necessário, já que a estirpe pode ou não se associar com a planta e promover a nodulação, sendo eficiente ou não.

Como exemplo tem-se a soja, na qual nem sempre a inoculação de estirpes eficientes garante uma boa nodulação (RAMOS & JÚNIOR, 1992). Há diversos fatores relacionados à planta, à bactéria e ao solo, que podem afetar a interação planta-*Rhizobium*. Dentre os fatores associados à planta e à bactéria, a especificidade hospedeira merece destaque (RAMOS & JÚNIOR, 1992). Na soja foram observadas plantas que não nodularam, ou que sofreram associações ineficientes como, a cultivar IAC-2 com o *Bradyrhizobium japonicum* (VARGAS & SUHET, 1980) e a cultivar IAC-2 com SEMIA 5021(OLIVEIRA & VIDOR, 1984), há, no entanto a necessidade de se obter um inóculo específico para essa cultivares.

No ano de 1988, identificaram-se exemplares de sabiá com ausência de acúleos, sendo seis do BAG forrageiras e duas no ensaio de competição do sabiá com cumaru (*Amburana cearensis*). A partir destas plantas, foram coletadas sementes para a produção de mudas. Observou-se que apenas 5% das plantas oriundas destas sementes apresentavam a característica ausência de acúleos, confirmando ser esta característica governada por genes recessivos (Oliveira & Drumond, 1989).

Alguns trabalhos vêm sendo realizados para seleção de plantas com esta característica, já que isso facilitaria o manejo dessa espécie e estimularia seu emprego em programas de reflorestamento no Nordeste. De modo particular, a ausência de acúleos é recomendável para o uso do sabiá como forrageira, permitindo uma melhor circulação de animais e de seus tratadores e diminuindo os riscos de ferimentos, e também para a obtenção de estacas (CARVALHO et al., s. d.). Por outro lado, quando a finalidade do plantio for à formação de cercas vivas, a presença de espinhos nas plantas torna-se uma característica desejável (RIBASKI et al., 2003).

Carvalho et. al. (s. d.), corroborando com Oliveira & Drumond (1989), concluíram que a ausência de acúleos no sabiá é um caráter recessivo, sendo necessários, porém, estudos complementares para explicar os mecanismos genéticos relacionados com essa ausência de acúleos.

De modo geral, o comportamento fenológico da espécie de sabiá varia com as características edafoclimáticas da região e com o material genético multiplicado (BARBOSA et al., 2008).

Pesquisas voltadas para especificidade de bactérias fixadoras de nitrogênio em plantas de sabiá sem acúleos ainda são desprovidas de estudo. Devido a todos esses fatores já discutido acima, pôde-se chegar à conclusão de que essas mudanças genéticas podem vir a interferir o processo natural de simbiose entre rizóbio-leguminosa. Fazendo com que não haja uma boa relação de especificidade e desse modo faça com que a inoculação de estirpes eficientes acarrete em uma má nodulação, ou que venha promover uma nodulação tardia.

CONCLUSÕES

- A colonização dos FMA em conjunto com as bactérias foi positiva, e as plantas de sabiá apresentaram maior comprimento de raiz com a co-inoculação dos microrganismos BR 3405 + *Azospirillum amazonenses* (Y2) e BR 3405 + *Herbaspirillum seropedicae* (Z67).
- A eficiência das estirpes obteve os melhores resultados nas plantas de sabiá quando as bactérias (MHB) estavam em presença de FMA obtendo a melhor resposta na co-inoculação BR 3405 + *Paenibacillus brasilensis* (24) + FMA.
- As plantas de sabiá com o fator fungos micorrízicos arbusculares foram superiores para massa seca da parte aérea e raiz, eficiência das estirpes e N acumulado, chegando a apresentar uma média em torno de 84% de colonização radicular.
- Há necessidade de novos estudos, seja para testar um período de tempo maior que 110 dias para as plantas de sabiá, em casa de vegetação, seja para testar estirpes de rizóbio que apresentem uma melhor especificidade hospedeira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, T. R. L.; SILVA, M. P. S. da.; BARROSO, D. G. **Plantio do sabiazeiro em pequenas e médias propriedades**. Programa Rio Rural, 14p., 2008. (Comunicado Técnico 02).

BURITY, H. A.; LYRA, M. do C. C. P. de L., SOUZA, E. S. de; Mergulhão, A. C. do E. S.; SILVA, M. L. R. B. da. Efetividade da inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares em mudas de sabiá submetidas a diferentes níveis de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 801-807, 2000.

CARVALHO, J. H. de.; MAIA, C. M. N. de A.; AMORIM, G. C. de. **Seleção de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) sem acúleos no Meio Norte**. Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro, s. d.

CASTRO, I. V. & FERREIRA, E. Nitrogen fixing symbioses adapted to contaminated soils. In: ARAÚJO, A. S. F. de; FIGUEIREDO, M. do V. B. **Microbial Ecology of Tropical Soils**. Nova Science Publishers. p. 1-18, 2011.

DE BOER, W.; FOLMAN, L. B.; SUMMERBELL, R. C.; BODDY, L. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 795-811, 2005.

DOBEREINER, J. **Inoculação cruzada e eficiência na simbiose de leguminosas tropicais**. In: Dobereiner, J.; Eira, P.A. da.; Franco, A.A. & Campelo, A.B.P., Eds. As leguminosas na agricultura tropical. p.181-192, 1971.

DÖBEREINER, J. **A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável**. CNPAB/EMBRAPA, SEROPÉDICA, RJ. s. d.

DRUMOND, M. A.; OLIVEIRA, V. R. de; LIMA, M. F. ***Mimosa caesalpinifolia*: Estudos de melhoramento genético realizados pela Embrapa Semiárido**. Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro, s. d.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. Rio de Janeiro, Centro Nacional de Pesquisa de Solos, p. 212, 1997.

EMBRAPA Solos, **Zoneamento Agroecológico de Pernambuco**. Disponível em: <http://www.uep.cnps.embrapa.br/zape/>. Acesso em: 25 jan. 2011.

EMBRAPA Monitoramento por satélite, **Mapeamento e Estimativa da Área Urbanizada do Brasil**. Disponível em: <http://www.urbanizacao.cnpm.embrapa.br/conteudo/uf/pe.html>. Acesso em: 27 out. 2011.

FIGUEIRÔA, J. M. de; PAREYN, F. G. C.; DRUMOND, M.; ARAÚJO, E. de L. Madeireiras. In: SAMPAIO, E. V. S. B.; PAREYN, F. G. C.; FIGUEIRÔA, J. M. de; SANTOS JÚNIOR, A. G. (Eds.). **Espécies da flora nordestina de**

importância econômica potencial. Recife: Associação Plantas do Nordeste, p. 101– 133, 2005.

FARIA, S. M. de & FRANCO, A. A. **Identificação de bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies de leguminosas arbóreas.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2002. 16p. (Embrapa Agrobiologia, Documentos, 158).

FRANCO, A. A. & BALIERO, F. de C. The Role of biological nitrogen fixation in land reclamation, agroecology and sustainability of tropical agriculture. In: ROCHA-MIRANDA, C. E. (Ed.). **Transition to global sustainability: the contribution of brasilian science.** Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, p. 209-234, 2000.

FREY-KLETT, P.; GARBAYE, J.; TARKKA, M. The mycorrhiza helper bacteria revisited. **New Phytologist**, v. 176, p. 22-36, 2007.

GARBAYE, J. Mycorrhiza helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, v. 128, p. 197–210, 1994.

GROSS, E.; CORDEIRO, L.; CAETANO, F. H. Nodulação e micorrização em *Anadenanthera peregrina* var. *falcata* em solo de Cerrado autoclavado e não autoclavado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 95-101, 2004.

HOAGLAND, D.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. **California Agriculture Experimental Station Circular**, p. 347, 1950.

JESUS, E. da C.; SCHIAVO, J. A.; FARIA, S. M. de. Dependência de micorrizas para a nodulação de leguminosas arbóreas tropicais. **Revista Árvore**, v. 29, p. 545-552, 2005.

LASTE, K. C. D.; GONÇALVES, F. S.; FARIA, S. M. de. **Estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para leguminosas com potencial de uso na recuperação de áreas mineradas.** Embrapa Agrobiologia, 8p., 2008. (Embrapa – Comunicado Técnico, 115).

LIMA, A. S. T. de; XAVIER, T. F.; LIMA, C. E. P. de; OLIVEIRA, J. de P., Mergulhão, A. C. do E. S.; FIGUEIREDO, M. do V. B. Triple inoculation with

Bradyrhizobium, *Glomus* e *Paenibacillus* on cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) development. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 919-926, 2011.

LIMA, A. S. T de. **Maximização da fixação biológica do N₂ pela interação BPCPs X RIZÓBIOS X FMA no caupi**. 2009. 45p. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

MENDES, M. M. C. **Crescimento de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) em resposta à inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares**. 2010. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais – Silvicultura) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

MERGULHÃO, A. C. do E. S.; SILVA, M. L. R. B. da; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P. Influência da dupla inoculação rizóbio e fungos micorrizas-arbusculares em plantas de sabiá sob solos de diferentes texturas. **Rev. Ecosistema**, v. 26, p. 42–47, 2001.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. **Nodulation of legumes by members of the b-subclass of Proteobacteria**. *Nature* 411:948-950, 2001.

NICOLSON T. H. & SCHENCK N. C. Endogonaceous mycorrhizal endophytes in Florida. **Mycologia** v.71, 178-198, 1979.

OLIVEIRA, L. A. de; VIDOR, C. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* em soja. I. Eficiência e especificidade hospedeira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 8, p.37-42, 1982.

PAULA, M. A.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J. Synergistic effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (*Ipomoea batatas*). **Biology and Fertility of Soils**, v. 14, p. 61-66, 1992.

PETERS, N.K. & LONG, S.R. **Alfafa root exudates and compounds, which promote or inhibit of *R. meliloti* nodulation genes**. *Plant Physiology*, v.88, p. 396-110, 1988.

RAMOS, M. L. G. & JÚNIOR, W. Q. R. Especificidade hospedeira entre estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e genótipos de soja com ciclo de maturação tardio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p. 259-263, 1992.

RIBASKI, J.; LIMA, P. C. F.; OLIVEIRA, V. R. de.; DRUMOND, M. A. **Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) árvore de múltiplo uso no Brasil**. Embrapa Semiárido, 4p., 2003 (Embrapa Semiárido, Circular Técnica, 104).

SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; COLAÇO, W. Fixação simbiótica de N₂ em leguminosas tropicais. Parte I – FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO N₂. In: FIGUEIREDO, M. do V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E. de R. e S. **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura**. 1.ed. Guaíba, Agrolivros. p. 17-41, 2008.

VARGAS, M. A. T. & SUHET, A. R. Efeito de tipos e níveis de inoculantes na soja cultivada em um solo de cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 15, p. 343-347, 1980.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria**. London: International Biological Programme, 164p. 1970. (IBP. Handbook, 15).

APÊNDICES

Tabela 1. Resumo da análise de variância para os dados de comprimento da raiz (CR) de sabiá, aos 110 dias após plantio (DAP), inoculadas com *Burkholderia sabiae* (BR 3405) e co-inoculadas com BR 3405 + mycorriza helper bacteria (MHB) na presença e ausência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA).

CR				
FONTE DE VARIÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Bactéria	8	644,3066667	80,53833333	0,0007
Fungo	1	777,1022685	777,1022685	<.0001
Bactéria*Fungo	8	339,0748148	42,3843519	0.0333

Tabela 2. Resumo da análise de variância para os dados de altura de planta (AP) de sabiá aos 45 dias após plantio (DAP) inoculadas com *Burkholderia sabiae* (BR 3405) e co-inoculadas com BR 3405 + mycorriza helper bacteria (MHB) na presença e ausência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA).

AP 45 dias				
FONTE DE VARIÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Bactéria	8	1400,329259	175,041157	0,0002
Fungo	1	5125,577963	5125,577963	<,0001
Bactéria*Fungo	8	687,340370	85,917546	0,0215

Tabela 3. Resumo da análise de variância para os dados de altura de planta (AP) de sabiá aos 90 dias após plantio (DAP) inoculadas com *Burkholderia sabiae* (BR 3405) e co-inoculadas com BR 3405 + mycorriza helper bacteria (MHB) na presença e ausência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA).

AP 90 dias				
FONTE DE VARIÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Bactéria	8	9514,06481	1189,25810	0,0002
Fungo	1	64774,72338	64774,72338	<,0001
Bactéria*Fungo	8	6415,87037	801,98380	0,0035

Tabela 4. Resumo da análise de variância para os dados de altura de planta (AP) de sabiá aos 110 dias após plantio (DAP) inoculadas com *Burkholderia sabiae* (BR 3405) e co-inoculadas com BR 3405 + mycorriza helper bacteria (MHB) na presença e ausência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA).

AP 110 dias				
FONTE DE VARIÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Bactéria	8	10685,46065	1335,68258	0,0003
Fungo	1	86560,07407	86560,07407	<,0001
Bactéria*Fungo	8	12014,15509	1501,76939	0,0001

Tabela 5. Resumo da análise de variância para os dados de massa seca da parte aérea (MSPA) de sabiá aos 110 dias após plantio (DAP) inoculadas com *Burkholderia sabiae* (BR 3405) e co-inoculadas com BR 3405 + mycorriza helper bacteria (MHB) na presença e ausência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA).

MSPA				
FONTE DE VARIÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Bactéria	8	25,2657750	3,1582219	0,7070
Fungo	1	475,2006685	475,206685	<,0001
Bactéria*Fungo	8	48,8119398	6,1014925	0,2715

Tabela 6. Resumo da análise de variância para os dados de nitrogênio acumulado (Nac) de sabiá aos 110 dias após plantio (DAP) inoculadas com *Burkholderia sabiae* (BR 3405) e co-inoculadas com BR 3405 + mycorriza helper bacteria (MHB) na presença e ausência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA).

Nac				
FONTE DE VARIÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Bactéria	8	1136,7251	3282,5030	0,2338
Fungo	1	26260,0237	231597,8864	<,0001
Bactéria*Fungo	8	25037,3013	3129,6627	0,2622

Tabela 7. Resumo da análise de variância para os dados de massa seca da raiz (MSR) de sabiá aos 110 dias após plantio (DAP) inoculadas com *Burkholderia sabiae* (BR 3405) e co-inoculadas com BR 3405 + mycorriza helper bacteria (MHB) na presença e ausência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA).

MSR				
FONTE DE VARIÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Bactéria	8	1,83276667	0,22909583	0,3281
Fungo	1	10,95300741	10,95300741	<,0001
Bactéria*Fungo	8	1,51129259	0,18891157	0,4621

Tabela 8. Resumo da análise de variância para os dados de massa seca da raiz pela massa seca as parte aérea (MSR/MSPA) de sabiá aos 110 dias após (DAP) inoculadas com *Burkholderia sabiae* (BR 3405) e co-inoculadas com BR 3405 + mycorriza helper bacteria (MHB) na presença e ausência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA).

MSR/MSPA				
FONTE DE VARIÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Bactéria	8	0,63697037	0,07962130	0,2914
Fungo	1	0,58697963	0,58697963	0,0042
Bactéria*Fungo	8	0,70037037	0,08754630	0,2332

Tabela 9. Resumo da análise de variância para os dados de colonização radicular (CoIR) de sabiá aos 110 dias após plantio (DAP) inoculadas com *Burkholderia sabiae* (BR 3405) e co-inoculadas com BR 3405 + mycorriza helper bacteria (MHB) na presença e ausência de fungos micorrízicos arbusculares (FMA).

CoIR				
FONTE DE VARIÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Bactéria	8	733,33333	91,66667	0,6717
Fungo	1	96266,66667	96266,66667	<,0001
Bactéria*Fungo	8	733,33333	91,66667	0,6717