



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

GISELE MILANI LOVATO

**INTERAÇÕES ENTRE MICORRIZA  
ARBUSCULAR E RIZOBACTÉRIAS EM  
LEGUMINOSAS ARBÓREAS NATIVAS  
DESTINADAS A REFLORESTAMENTO**

---

LONDRINA  
2006

**GISELE MILANI LOVATO**

**INTERAÇÕES ENTRE MICORRIZA ARBUSCULARS E  
RIZOBACTÉRIAS EM LEGUMINOSAS ARBÓREAS  
DESTINADAS A REFLORESTAMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira

Londrina  
2006

**GISELE MILANI LOVATO**

**INTERAÇÕES ENTRE MICORRIZA ARBUSCULARS E  
RIZOBACTÉRIAS EM LEGUMINOSAS ARBÓREAS DESTINADAS A  
REFLORESTAMENTO**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira

---

Prof. Dr. Galdino Andrade Filho

---

Prof. Dr. Arnaldo Colozzi Filho

---

Prof. Dr. Fernando Gomes Barcellos (1º  
Suplente)

---

Prof. Dr. Élcio Libório Balota (2º Suplente)

Londrina, 09 de fevereiro de 2006.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Antonio e Domingas, que me deram educação, amor, apoio, incentivo e exemplo de vida. A eles meu eterno amor e gratidão.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido saúde, força e disposição para vencer todos os obstáculos.

À minha família, presente sempre com orações, carinho e palavras de incentivo, e pelo esforço desempenhado para chegar onde cheguei.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira, orientador e grande amigo, pela atenção, carinho, compreensão e orientação valiosíssima, e por ter acreditado e me fazer acreditar em mim, minha eterna admiração.

Ao Prof. Dr. Galdino Andrade Filho, que primeiramente me acolheu como orientador em seu laboratório, pela confiança, ajuda e pela grande amizade, minha consideração e gratidão.

Ao técnico de laboratório Márcio Ferreira Cruz, por todo auxílio, valiosa amizade e companhia constante.

Aos amigos de laboratório, não são apenas colegas. Pude construir verdadeiras amizades, as quais recordarei sempre com muito carinho e saudade. Meu especial agradecimento por todos os momentos valiosos que passei na companhia de vocês.

Aos meus amigos Flávia, Letícia, Ariane, Andréa, Juliana, Wannner, André, Marcell, Cleiton, Danielle, Carla, Graziela, pelo companherismo, incentivo, credibilidade e grande amizade.

A todos que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho.

Muito Obrigada.

“Mestre não é quem  
sempre ensina, mas quem de repente aprende.”

João Guimarães Rosa

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	9
2.1 ÁREAS DEGRADADAS E REFLORESTAMENTO .....	9
2.2 PAPEL DOS MICRORGANISMOS.....	11
2.2.1 Micorrizas .....	12
2.2.2 Bactérias Fixadoras de Nitrogênio.....	16
2.2.3 Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas .....	19
2.3 EFEITOS SINERGÍSTICOS ENTRE FMA E RIZOBACTÉRIAS EM LEGUMINOSAS ARBÓREAS.....	21
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	24
3.1 OBJETIVO GERAL.....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	25
<b>ARTIGO: INTERACTIONS BETWEEN ARBUSCULAR MYCORRHIZA AND RHIZOBIA ON NATIVE WOODY LEGUMINOUS TREES USEFUL IN REFORESTATION</b> .....	32

## 1 INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento mundial, várias atividades antrópicas vêm causando alterações no ambiente, dentre elas os desmatamentos, que geralmente ocorrem para fins lucrativos e podem resultar na degradação do solo e da água. Quanto à degradação do solo, a erosão é o principal fator, ocasionando a remoção de seu horizonte superficial e a diminuição da fertilidade do solo, como resultado da perda de nutrientes e matéria orgânica. Além da degradação das propriedades físicas e químicas do solo, a degradação das propriedades biológicas também limita o restabelecimento e manutenção vegetal.

A revegetação de áreas degradadas é um processo geralmente oneroso devido aos custos com instalação das mudas, necessidade de adubação devida à baixa fertilidade dos solos e replantio devido à morte de mudas transplantadas. A busca de alternativas viáveis para a revegetação, baseadas em conhecimentos adquiridos em pesquisas científicas, pode contribuir para reduzir esses custos. O uso de espécies arbóreas nativas reduz o impacto no ambiente a ser revegetado e contribui para a recuperação e conservação da biodiversidade, melhorando as condições para recuperar a diversidade e atividade biológica do solo, que contribui para a ciclagem de nutrientes.

Para um melhor resultado com o uso das espécies arbóreas nativas na revegetação, é necessário o conhecimento dos requerimentos ambientais e nutricionais das plantas a serem utilizadas, desde a etapa primordial de formação de mudas até o seu estabelecimento e desenvolvimento a campo.

O N e o P são os nutrientes mais requeridos pelas plantas e são limitantes ao seu crescimento, principalmente em solos degradados. O N é

facilmente perdido no solo devido sua alta dinâmica e o P possui baixa mobilidade no solo, fazendo-se necessário o uso de fertilizantes nitrogenados e fosfatados no processo de revegetação o que contribui para o aumento dos custos.

Com a finalidade de diminuir os custos ambientais, como por exemplo poluição, e econômicos em revegetações, vem sendo pesquisado e praticado o uso de microrganismos que fazem o papel de biofertilizantes, que quando aplicados no solo ou nas plantas auxiliam o crescimento destas através do aumento da disponibilidade e suprimento de nutrientes.

Dentre os microrganismos utilizados como biofertilizantes destacam-se as bactérias diazotróficas, que disponibilizam N à planta a partir do N<sub>2</sub> atmosférico. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) também desempenham importante papel, pois aumentam o volume de solo explorado pelas raízes, auxiliando a planta na obtenção de nutrientes como o P, além de aumentar o acesso da planta à água, contribuir para redução de danos causados por patógenos, e de proteger contra outros estresses abióticos. A dupla inoculação destes microrganismos aumenta o benefício dos hospedeiros por conferir a estes maior capacidade de absorção de nutrientes, contribuindo com o seu estabelecimento, crescimento e sobrevivência, o que auxilia na redução de custos econômicos e ambientais com uso de fertilizantes químicos.

Com relação à interação tripartite (planta, FMA e bactérias diazotróficas) a maioria dos gêneros da família Mimoseae possui capacidade de formar nódulos quando em simbiose com bactérias fixadoras de N. No entanto, a maioria das plantas também pode formar simbiose com FMA. A fixação biológica do N (associativa ou simbiótica) pode ser incrementada na presença de FMA, enquanto que a colonização micorrízica também pode ser estimulada na presença de bactérias diazotróficas. Nesse caso, a presença dos dois simbiontes na mesma planta pode conferir uma vantagem adicional para ambos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ÁREAS DEGRADAS E REFLORESTAMENTO

As atividades antrópicas, em muitas situações, podem causar impacto negativo no ambiente. A eliminação de extensas áreas de vegetação nativa favorece a degradação ambiental, incluindo o solo e a água, devido à ausência ou escassez de cobertura vegetal adequada (Caravaca et al., 2003; Thrall et al., 2005). Dentre estas atividades, pode-se destacar a construção de estradas, de barragens, aeroportos, mineração e áreas agrícolas mal manejadas. A erosão é um dos principais fatores de degradação do solo, o que resulta na remoção de seu horizonte superficial, ocasionando perda de nutrientes, matéria orgânica, diminuição da atividade e diversidade biológica e alterações nas propriedades físicas do solo, que limitam sua capacidade de possibilitar o restabelecimento e/ou manutenção vegetal tanto natural como através de programas de revegetação (Zangaro et al., 2003).

Devido ao aumento da consciência sobre a importância da preservação ambiental, aliado ao avanço das leis que disciplinam a ação antrópica sobre as florestas de proteção, há crescente interesse em programas de revegetação de áreas degradadas, o que demanda conhecimentos técnico-científicos pelos potenciais usuários desses programas (Macedo, 1993).

Os processos de revegetação são, na maioria das vezes, onerosos, devido ao custo de produção e instalação das mudas. Esses custos são ainda maiores quando a área a ser revegetada é de baixa fertilidade natural, ou está degradada por processos erosivos, ou ainda quando há necessidade de replantio das mudas devido a mortes ocorridas pelo estresse de transplante. Nesses casos, é

preciso buscar alternativas economicamente viáveis a serem empregadas nas estratégias de revegetação.

A sucessão vegetal em áreas degradadas é imprevisível (Jordan, 1991) devido, principalmente, à ausência de banco de sementes e à geralmente baixa fertilidade do solo. Nestes casos há necessidade de se praticar o reflorestamento artificial com espécies nativas ou exóticas apropriadas. No processo de reflorestamento, dois componentes são essenciais: o ambiente edáfico, representado pelo solo e suas propriedades físicas, químicas e biológicas, e as espécies arbóreas selecionadas ou disponíveis, cujo êxito na área vai depender da capacidade da plântula em captar recursos do solo para o seu desenvolvimento (Zangaro, 1997). Assim, a unidade básica do reflorestamento artificial é a árvore individual, cujos requerimentos ambientais e nutricionais, desde a formação das mudas até seu desenvolvimento a campo, precisam ser conhecidos (Carneiro et al., 1996).

Espécies arbóreas podem aumentar as taxas de infiltração de água no solo através da redução do impacto da chuva e da adição de matéria orgânica dos folhedos, que contribuem para melhorar a estrutura e a capacidade de retenção de água, por serem fontes de matéria orgânica (Caravaca et al., 2003).

A utilização de espécies nativas para reflorestamento ou recomposição florística de áreas desmatadas é de grande importância para reduzir o impacto ambiental e propiciar a conservação da biodiversidade (Carneiro et al., 1998). O que desencoraja o uso de algumas espécies em revegetações é a lenta taxa de crescimento que apresentam. Entretanto, muitas espécies leguminosas arbóreas tropicais crescem rapidamente, mas o seu sucesso depende do suprimento ideal de nutrientes (Marques et al., 2001).

O nitrogênio (N) é um dos nutrientes mais exigidos pelas plantas, mas é facilmente perdido no solo, devido à sua dinâmica. Sendo assim, pode haver necessidade de se fazer adubação nitrogenada de manutenção para o bom desenvolvimento das mudas, onerando os custos de instalação e manutenção. Além do nitrogênio, o fósforo (P) também é limitante ao crescimento vegetal, pelos baixos teores geralmente encontrados nos solos tropicais e subtropicais (Franco & Faria, 1997).

## **2.2 PAPEL DOS MICROORGANISMOS**

Em um ecossistema, todos os seres vivos interagem entre si e estão em permanente contato. As interações microbianas no solo são expressas por fenômenos antagônicos, competições ou associações, sendo mais intensas no solo rizosférico. De acordo com Paul & Clark (1989), a rizosfera é a região do solo que recebe influência imediata das raízes e na qual ocorre intensa proliferação de microorganismos. Essas interações também ocorrem no rizoplano, o qual inclui a epiderme e o mucigel (Walker et al., 2003), compreendendo uma parte dos fenômenos biológicos da rizosfera (Andrade, 1999).

Os biofertilizantes são definidos por Vessey (2003) como substâncias que contêm microrganismos vivos que, quando aplicados à semente, superfície das plantas ou no solo, colonizam a rizosfera ou o interior da planta e promovem seu crescimento por aumentar o suprimento ou a disponibilidade de nutrientes. Sob essa óptica, o emprego de biofertilizantes apresenta grande potencial de utilização para

produção de mudas de espécies florestais nativas, contribuindo para diminuir os custos de produção e instalação dessas mudas.

A composição da biota e sua presença na rizosfera podem interferir diretamente na aquisição de nutrientes na relação solo-planta. Os efeitos podem ser benéficos, favorecendo a captação de nutrientes, mineralização da matéria orgânica, produção de enzimas, vitaminas e hormônios (Barea et al., 2002; Artursson et al., 2005), ou maléficis, quando há competição por nutrientes ou mesmo a ocorrência de doenças.

O emprego de microrganismos com a finalidade de aumentar a disponibilidade de nutrientes às plantas, em substituição ou adição aos fertilizantes, depende de características como a possibilidade de serem cultivados e se associarem às plantas. Essa é uma prática que merece investigação por geralmente ser econômica e ecologicamente mais viável. A produção de mudas com alta qualidade morfofisiológica é um dos fatores mais importantes para o sucesso dos programas de revegetação. Os programas de recuperação ambiental muitas vezes são prejudicados pela baixa sobrevivência e desenvolvimento das mudas após o plantio. No entanto, a inclusão de alguns microrganismos simbiotes pode contribuir para o aumento da qualidade das mudas, pois promovem maior tolerância a estresses e favorecem a absorção de nutrientes ( Schiavo & Martins, 2003).

### **2.2.1 Micorrizas**

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), são membros relevantes na comunidade microsimbionte mutualística da rizosfera (Barea et al., 2002).

Micorriza é um termo que se refere às associações mutualísticas entre raízes de plantas e espécies de determinados fungos e constitui-se de três grupos principais: ectomicorrizas, micorrizas ericóides e endomicorrizas (Colozzi-Filho & Balota, 1994). As endomicorrizas arbusculares são formadas por fungos da ordem Glomales, classe Zigomicota, de ocorrência generalizada nas plantas vasculares e possuem funções essenciais no ecossistema, como na cooperação no estabelecimento de plantas, aumento da absorção de nutrientes, proteção contra estresses ambientais, melhoramento das propriedades físicas do solo (Barea et al., 2002), além de estarem envolvidas na conservação, armazenagem e ciclagem de nutrientes nos ecossistemas (Pereira et al., 1996).

Na sua associação com as plantas, após a infecção das raízes, ocorre o crescimento do micélio na região do córtex, com ramificações das hifas inter e intracelularmente. As ramificações intracelulares originam estruturas típicas especializadas denominadas arbúsculos, onde é realizada a maioria das trocas entre o endófito e o hospedeiro (Colozzi-Filho & Balota, 1994). O fungo leva nutrientes para a planta, principalmente o P, enquanto esta supre o fungo com carboidratos fotoassimilados (Li et al., 1991). Segundo Barea et al. (2002), o estabelecimento da simbiose micorrízica modifica vários aspectos da fisiologia da planta, incluindo a proporção de nutrientes minerais, padrão de alocação de C e balanço hormonal. A transferência bidirecional de nutrientes através da interface simbiótica envolve efluxo passivo de solutos do doador, dentro de uma interface apoplática, seguido de uma tomada ativa pelo organismo receptor (Ferrol et al., 2002).

O micélio extraradicular do fungo micorrízico arbuscular consiste em uma rede de hifas. A hifa externa prolifera pelo solo e aumenta a área de superfície para a absorção de nutrientes como o P, Cu, Zn e N (Hawkins & George,

2001;Neumann & George, 2005). A hifa externa do fungo simbiote pode ser considerada uma via que diminui a distância, principalmente do P no solo, às estruturas de absorção da planta (Zangaro et al., 2005), transportando e transferindo os nutrientes ao hospedeiro. As hifas extraradiculares podem atingir até 8 cm além da superfície da raiz (Colozzi-Filho & Balota, 1994), aumentando o potencial para a obtenção de nutrientes e água. Ainda segundo Neumann & George (2005), as hifas externas contribuem para a estabilidade dos agregados do solo, através da produção de uma proteína denominada glomalina (Caravaca et al., 2005), protegem os hospedeiros dos níveis tóxicos de elementos deletérios no meio de crescimento como os metais pesados e também, em algumas condições, agem como fontes iniciais de colonização radicular.

Devido à baixa fertilidade natural e ao baixo potencial de inóculo de microorganismos benéficos para as plantas, como os FMA no solo de áreas destinadas ao reflorestamento (Zangaro et al., 2003), o conhecimento sobre a capacidade das plantas em formar simbioses eficientes com os FMA é de fundamental importância para o sucesso do reflorestamento, podendo determinar a necessidade ou não de inoculação das plantas na fase de formação de mudas (Carneiro et al., 1998).

Plantas colonizadas por FMA possuem um aumento na matéria seca de raiz e de parte aérea e melhores concentrações de P nos tecidos hospedeiros (Zangaro et al., 2003). Segundo Carneiro et al. (1996), além dos efeitos no crescimento inicial e na qualidade das mudas, evidências indicam que a colonização micorrízica afeta as futuras fases sucessionais das espécies e a estruturação das comunidades vegetais. Desse modo, os FMA são importantes para o reflorestamento artificial, especialmente em solos de baixa fertilidade, onde poderão

reduzir os requerimentos nutricionais dos hospedeiros, diminuir os custos de implantação e aumentar as chances de sobrevivência e estabelecimento das mudas no ecossistema em restauração.

A resposta das plantas à inoculação micorrízica varia com a espécie, permitindo-se classificá-las como micotróficas obrigatórias (crescimento extremamente reduzido sem micorriza), micotróficas facultativas (podem crescer na ausência do simbionte, sendo menos responsivas a este) e não micotróficas (não respondem e não se beneficiam da interação). De acordo com Janos (1996), as micotróficas facultativas podem apresentar grande dependência micorrízica em solos de baixa fertilidade, enquanto que as obrigatórias crescem sem micorriza somente quando intensamente supridas de fertilizantes. Já as não micotróficas não formam associação mesmo em ambiente de baixa fertilidade. De acordo com Zangaro & Andrade (2002), a dependência micorrízica de acordo com os grupos sucessionais diminui na seguinte ordem: pioneiras > secundárias iniciais > secundárias tardias > clímaxes. As espécies pioneiras e secundárias iniciais são de rápido crescimento e propiciam ambiente adequado para o estabelecimento dos demais grupos sucessionais. O alto micotrofismo dessas espécies e o conseqüente aumento de sua capacidade competitiva elegem as associações micorrízicas como uma das principais ferramentas para a instalação e o desenvolvimento inicial dessas plantas em programas de reflorestamento.

A seleção de fungos micorrízicos arbusculares eficientes é um pré-requisito essencial nos programas de inoculação, uma vez que existem diferentes níveis de compatibilidade entre estes e suas plantas hospedeiras (Roldán et al., 1992) e que a eficiência destes fungos depende das espécies de plantas a serem inoculadas (Caravaca et al., 2003). Apesar da colonização micorrízica não ser

hospedeiro-específica, a eficiência da simbiose depende da interação entre a espécie da planta com o fungo e o ambiente. A falta de relação entre a infectividade e a eficiência do fungo em promover o crescimento do hospedeiro pode estar relacionada ao tempo necessário ao estabelecimento da colonização radicular, sobretudo nas culturas anuais (Abbott & Robson, 1981). Por exemplo, os endofíticos do gênero *Gigaspora* não são tão eficientes em promover o crescimento de culturas anuais (Paula et al., 1988; Nogueira & Cardoso, 2000), mas são bastante eficientes em promover crescimento de hospedeiros perenes (Siqueira et al., 1993; Antunes et al., 1998). Em alguns casos de interações pouco eficientes, embora haja colonização significativa das raízes, os fungos não produzem quantidade suficiente de micélio externo para auxiliar a planta a explorar o substrato (Siqueira et al., 1994).

### **2.2.2 Bactérias Fixadoras de Nitrogênio**

Um dos principais processos envolvidos na manutenção da vida nos ecossistemas é a fixação biológica de nitrogênio (FBN), sendo também um exemplo de interação sinérgica entre microrganismos e vegetais (Albino, 2004).

O nitrogênio é o nutriente requerido em maior quantidade pelas plantas, que podem obtê-lo no solo, proveniente principalmente da decomposição de matéria orgânica, dos fertilizantes, e pelo processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) (Hungria, 1994).

O  $N_2$  compõe 78% da atmosfera, porém nesta forma não é acessível aos eucariotos e à maioria dos procariotos. Uma pequena parcela dos procariotos possui a enzima nitrogenase, que é capaz de reduzir o  $N_2$  para a forma inorgânica

combinada  $\text{NH}_3$ , que pode se tornar disponível para plantas e outros organismos. Esta pequena parcela de organismos procariotos é chamada de fixadores de  $\text{N}_2$  ou diazotróficos (Moreira & Siqueira, 2002).

O complexo enzimático nitrogenase é formado por uma unidade protéica maior, contendo átomos de ferro e outra menor com ferro e molibdênio. A nitrogenase rompe a tripla ligação existente entre os dois átomos do nitrogênio atmosférico e o transforma na forma utilizável pela planta,  $\text{NH}_3$  (Albino, 2004). Esse complexo enzimático é inibido na presença de  $\text{O}_2$ . Os simbiossiontes da família Rhizobiaceae, que se associam às leguminosas, e os simbiossiontes do gênero *Frankia*, se localizam em hipertrofias especializadas denominadas nódulos, que abrigam as bactérias, modificadas em bacterióides. Ali desenvolvem substâncias semelhantes à hemoglobina, leghemoglobina nas leguminosas, que regulam a quantidade de  $\text{O}_2$  que chega até os bacterióides. Os diazotróficos de vida livre também desenvolveram estratégias para diminuir a quantidade de  $\text{O}_2$ , como: proteção respiratória, proteção conformacional, produção de polissacarídeos extracelulares, formação de células especializadas ou locomoção de células (Moreira & Siqueira, 2002).

Para que a amônia, forma de N incorporada pela planta, seja transportada para os locais de demanda, é transformada, no citosol, para a forma orgânica por meio das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintetase (GOGAT), e então assimilada. Este nitrogênio orgânico pode ser transportado para as partes superiores da planta na forma de N-Ureídeos (alantoína e ácido alantóico) (Munoz et al., 2001). Os produtos nitrogenados sintetizados nos nódulos são exportados rapidamente para a parte aérea do hospedeiro, via xilema, pelo fluxo da transpiração. A análise dos compostos nitrogenados na seiva do xilema é importante em estudos fisiológicos, permitindo avaliar as variações metabólicas do

microsimbionte e do hospedeiro, efeito de estresses ambientais, etc. (Hungria, 1994).

Vários gêneros de bactérias foram descritos como fixadores de nitrogênio, como: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Paenobacillus* e *Pseudomonas* (Moreira & Siqueira, 2002; Cocking, 2003; Dobbelaere et al., 2003). As bactérias diazotróficas penetram as raízes das plantas a partir da rizosfera, por pontos de emergência das raízes laterais, por entre as células epidérmicas, através dos pêlos radiculares, estômatos ou através de vetores como os FMA (Franke et al., 2000; Cocking, 2003). Algumas bactérias do gênero *Rhizobium* e *Pseudomonas* se aderem a hifas de FMA, através de polissacarídeos, em que os fungos fazem papel de um veículo para a colonização das raízes por essas bactérias (Bianciotto et al., 2000; Bianciotto et al., 2001). Bactérias do gênero *Burkholderia* foram identificadas como endosimbiontes em membros de *Gigasporaceae*, sendo a espécie *Gigaspora margarita* a mais estudada (Bianciotto et al., 2000; Bianciotto et al., 1996b).

Entre os sistemas biológicos envolvendo planta e microorganismos, o de maior expressão econômica é a simbiose leguminosa-rizóbio (Burity et al., 2000). Em ambientes com deficiência de N, a fixação biológica simbiótica, através da associação entre leguminosas e rizóbio, auxilia o estabelecimento, rápido crescimento e aumento de sobrevivência das plântulas de *Acacia* spp (Thrall et al., 2005). As espécies de plantas e a disponibilidade de N no solo são fatores que determinam a importância dos microrganismos diazotróficos para a nutrição de N. Em solos com altos níveis de N a FBN é reprimida (Cocking, 2003). Como a sobrevivência de rizóbio no solo é dependente da presença de seus hospedeiros,

rizóbios nativos geralmente não são detectados ou o potencial de inóculo é muito reduzido em solos onde leguminosas nativas foram exterminadas (Thrall et al., 2001). Isso torna necessária a inoculação espécie-específica destes microrganismos, nas mudas destinadas a revegetação.

Bactérias diazotróficas associativas exercem efeitos positivos no crescimento das plantas diretamente ou indiretamente por diferentes mecanismos. Além da fixação de  $N_2$ , podem afetar o crescimento das plantas diretamente pela síntese de fitormônios e vitaminas, inibição da síntese de etileno das plantas, melhoria na absorção de nutrientes, aumento de resistência a estresses, solubilização de fosfato inorgânico e mineralização de fosfato orgânico (Dobbelaere et al., 2003).

### **2.2.3 Rizobacterias promotoras do crescimento de plantas**

Bactérias rizosféricas simbiontes (quando associadas às não leguminosas) e associativas que estimulam o crescimento das plantas podem ser chamadas de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, das iniciais em inglês, PGPR (Dobbelaere et al., 2003; Artursson et al., 2005). Essas PGPR podem exercer efeitos positivos nas plantas através da secreção de reguladores de crescimento de plantas como auxinas e giberelinas que estimulam atividades metabólicas nas raízes. Além disso, podem aumentar o suprimento de nitrogênio fixado biologicamente, podendo ser então, os benefícios da FBN sinérgicos aos efeitos das PGPR (Cocking, 2003). Espécies pertencentes aos gêneros *Acetobacter*,

*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum* e *Pseudomonas* estão incluídas nesse grupo de rizobactérias (Dobbelaere et al., 2003).

As PGPR estão geralmente em contato com a superfície das raízes e aumentam a produção da planta através de mecanismos como melhora da nutrição mineral, supressão de doenças ou produção de fitormônios (Weller, 1988; Broek & Vanderleyden, 1995). Considera-se que os efeitos benéficos de algumas PGPR sejam devidos às suas interações com FMA como, por exemplo, aumentando o crescimento micelial destes, otimizando a formação e funcionamento das simbioses micorrízicas (Artursson et al., 2006). O ácido indol acético (AIA) é o fitormônio mais comumente produzido por essas bactérias. Estima-se que 80% das bactérias isoladas da rizosfera possam produzir AIA (Vessey, 2003). Essas bactérias podem atuar também solubilizando fosfato, tornando o P disponível às plantas e aumentando assim o seu crescimento. Pode haver ainda a produção de sideróforos que facilitam o transporte de ferro para a planta (Bevivino et al, 1998).

### 2.3 EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE FMA E RIZOBACTÉRIAS EM LEGUMINOSAS ARBÓREAS

Plantas que se associam às bactérias diazotróficas e FMA apresentam grande potencial de utilização para revegetação (Franco & Faria, 1997). Nesse caso, enquanto as bactérias diazotróficas disponibilizam N às plantas, os fungos micorrízicos aumentam o volume de solo explorado pelas raízes, auxiliando-as a obter nutrientes de baixa mobilidade, principalmente o P (Siqueira et al., 1994). Isso contribui para o estabelecimento, crescimento e sobrevivência das plantas por meio da redução do estresse causado por fatores como a limitação de alguns nutrientes e a disponibilidade de água (Janos, 1996; Sylvia & Williams, 1992). Assim, mudas micorrizadas apresentam maior índice de sobrevivência quando transplantadas para o campo, além de apresentarem maior vigor no seu desenvolvimento inicial (Siqueira et al., 1993; Siqueira et al., 1998; Marques et al., 2001). Além disso, são vários os relatos de que a fixação biológica de N, tanto simbiótica quanto associativa, é incrementada em plantas associadas a fungos micorrízicos. Por outro lado, a presença dessas bactérias também pode estimular a colonização micorrízica (Toro et al., 1997), aumentando os benefícios ao hospedeiro a partir dessa associação.

As leguminosas associadas a rizóbio e FMA têm sido utilizadas em programas de recuperação de áreas degradadas, em sistema agroflorestais e agropastoris. A associação das leguminosas com esses dois simbioss é chamada de simbiose tripartite (Xavier & Germida, 2002). Algumas estirpes selecionadas de rizóbio podem permitir à planta auto-suficiência em N, com resultados superiores à aplicação de N mineral (Rodrigues et al., 2003). Segundo Xavier & Germida (2002), a resposta da leguminosa hospedeira ao *Rhizobium* pode ser modificada pelas

espécies FMA envolvidas na associação tripartite, e que os benefícios à planta nessa simbiose são superiores aos das plantas controle não inoculadas, ou àquelas inoculadas isoladamente com FMA ou *Rhizobium*.

A maioria dos gêneros da família Mimoseae pode nodular e formar simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, embora haja exceções. Além do mais, podem também estabelecer simbiose mutualística com FMA (Patreze & Cordeiro, 2004).

Em geral, os benefícios para a planta nessa tripla associação são: aumento do crescimento e produção das plantas; melhora na nutrição de N e P; controle de doenças; resistência à seca; solubilização de fosfato; aumento na nodulação e colonização das raízes por FMA (Marques et al., 2001; Xavier & Germida, 2003). A simbiose micorrízica geralmente apresenta efeito sinérgico sobre a nodulação (Barea et al., 2002). A dupla inoculação é capaz de reduzir os custos com fertilizantes nitrogenados e fosfatados, por conferir às plantas maior capacidade de absorção de seus nutrientes (Burity et al., 2000; Jia et al., 2004).

Segundo Barea et al. (2002), existem bactérias denominadas *helper*, que auxiliam na formação e funcionamento das micorrizas por estimularem o crescimento micelial dos fungos, além de produzirem compostos que aumentam a permeabilidade das raízes, facilitando sua penetração pelos fungos. No caso de *Glomus mosseae* e *Pseudomonas* sp foi observado aumento na produção de vitaminas, aminoácidos e hormônios, os quais podem estimular o crescimento das plantas ou dos próprios microrganismos (Barea et al., 1998). Há relatos de que certos isolados de *Bacillus* estimulam a micorrização (Alten et al., 1993; Aboul-Nasr, 1996) e, conseqüentemente, a produção de micélio externo, fato que pode alterar a eficiência da simbiose (Nogueira, 2001).

O fornecimento de nitrogênio às plantas por bactérias diazotróficas pode ser aumentado pela associação conjunta com FMA. Uma explicação para o aumento na fixação de  $N_2$  em plantas micorrizadas é que quando, N e P são limitantes, os FMA podem aumentar a absorção de P pela planta, conferindo à planta melhores condições de fornecer mais energia para a fixação de  $N_2$  por *Rhizobium* na forma de ATP (Artursson et al., 2005).

Segundo Xavier & Germida (2003), o crescimento e a produtividade de leguminosas são dependentes de uma combinação específica de FMA e rizóbio, indicando que há melhores resultados em interações sinérgicas entre microssimbiontes compatíveis.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

- Identificar a(as) interação(ões) mais eficiente(s) entre 4 espécies arbóreas leguminosas nativas e 4 espécies de fungos micorrízicos, na presença e ausência de rizobactérias.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar o efeito sinérgico de fungos micorrízicos sobre a nodulação das raízes, crescimento das plantas e o acúmulo de N e P por espécies leguminosas, quando inoculadas com bactérias fixadoras de N;

- Caracterizar o efeito das estirpes de rizobactérias sobre a colonização radicular e produção de micélio externo por espécies de fungos micorrízicos.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, L. K.; ROBSON, A. D. Infectivity and effectiveness of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi: effect of inoculation type. *Australian Journal of Agricultural Research* 32:631-639, 1981.
- ABOUL-NASR, A. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza by *Bacillus micoides* on flax. *Alexandria Journal of Agricultural Research* 41:261-270, 1996.
- ALBINO, U.B. Isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas associadas à planta carnívora *Drosera villosa* var. *villosa* e seu potencial como inoculante de plantas arbóreas nativas. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Londrina, 92p, 2004.
- ALTEN, H. von; LINDERMANN, A.; SCHOENBECK, F. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza by fungicides or rhizosphere bacteria. *Mycorrhiza* 2:167-173, 1993.
- ANDRADE, G. Interacciones microbianas em la rizosfera. in Siqueira, J. O.; Moreira, F. M. S.; Lopes, A. S., et al. (eds.). *Soil fertility, soil biology and plant nutrition interrelationships*. Lavras: UFLA Editor, Pp.551-575, 1999.
- ANTUNES, V.; SILVEIRA, A. P.; CARDOSO, E. J. B. N. Interação entre diferentes tipos de solo e fungos micorrízicos vesículo-arbusculares na produção de mudas de café (*Coffea arábica*, L.). *Turrialba* 38:117-122, 1998.
- ARTURSSON, V.; FINLAY, R. D.; JANSSON, J. K. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology* 8:1-10, 2006.
- BAREA, J. M.; ANDRADE, G.; BIANCIOTTO, V.; DOWLING, D.; LOHRKE, S.; BONFANTE, P.; O'GARA, F.; AZCON-AGUILAR, C. Impact on arbuscular mycorrhiza formation of *Pseudomonas* strains used as inoculants for biocontrol of soil-borne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 64:2304-2307, 1998.
- BAREA, J. M.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:343-351, 2002.
- BEVIVINO, A.; SARROCO, S.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; CANTALE, S.; CHIARINI, L. Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. *FEMS Microbiology Ecology* 27: 225-237, 1998.

- BIANCIOTTO, V.; BANDI, C.; MINERDI, D.; SIRONI, M.; TICHY, H. V.; BONFANTE, P. An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 62:3005-3010, 1996b.
- BIANCIOTTO, V.; LUMINI, E.; LANFRANCO, L.; MINERDI, D.; BONFANTE, P.; PEROTTO, S. Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the family *Gigasporaceae*. *Applied Environmental Microbiology* 66: 4503-4509, 2000.
- BIANCIOTTO, V.; ANDREOTTI, S.; BALESTRINI, R.; BONFANTE, P.; PEROTTO, S. Extracellular polysaccharides are involved in the attachment of *Azospirillum brasiliense* and *Rhizobium leguminosarum* to arbuscular mycorrhizal structures. *Eur J Histochem* 45:39-49, 2001.
- BROEK, A. V.; VANDERLEYDEN, J. Genetics of the *Azospirillum*-plant root association. *Critical Revist of Plant and Science* 14: 445-466, 1995.
- BURITY, H. A.; LYRA, M. C. C. P.; SOUZA, E. S.; MERGULHÃO, A. C. E. S.; SILVA, M. L. R. B. Effectiveness of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* sp. on *Mimosa caesalpinifolia* seedlings, under different phosphorus levels. *Pesquisa agropecuária brasileira* 35:801-807, 2000.
- CARAVACA, F.; BAREA, J.M.; PALENZUELA, J.; FIGUEROA, D.; ALGUACIL, M.M.; ROLDÁN, A. Establishment of shrub species in a degraded semiarid site after inoculation with native or allochthonous arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology* 22:103-111, 2003.
- CARAVACA, F.; ALGUACIL, M. M.; BAREA, J. M.; ROLDÁN, A. Survival of inocula and native AM fungi species associated with shrubs in a degraded Mediterranean ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry* 37:227-233, 2005.
- CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; CARVALHO, D.; BOTELHO, S. A.; JUNIOR, O. J. S. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas e arbustivas nativas de ocorrência no sudeste do Brasil. *Cerne* 4:129-145, 1998.
- CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; DAVIDE, A. C.; GOMES, L. J.; CURI, N.; VALE, F. R. Mycorrhizal fungi and superphosphate on growth of tropical woody species. *Scientia Forestalis* 50:21-36, 1996.
- COCKING, E. C. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant and Soil* 252:169-175, 2003.
- COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E. L. *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. Brasília: EMBRAPA, 542 pp, 1994.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22:107-149, 2003.

- FERROL, N.; BAREA, J. M.; AZCÓN-AGUILAR, C. Mechanisms of nutrient transport across interfaces in arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil* 244:231-237, 2002.
- FRANCO, A. A.; FARIA, S. M. The contribution of N<sub>2</sub>-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biology and Biochemistry* 29:897-903, 1997.
- FRANKE, I. H.; FEGAN, M.; HAYWARD, C. Molecular detection of *Gluconacetobacter sacchari* associated with the pink sugarcane mealybug *Saccharicoccus sacchari* (Cockerell) and the sugarcane leaf sheath microenvironment by FISH and PCR. *Microbiology Ecology* 31:61-71, 2000.
- HAWKINS, H-J.; GEORGE, E. Reduced N-15-nitrogen transport through arbuscular mycorrhizal hyphae to *Triticum aestivum* L. supplied with ammonium vs. nitrate nutrition. *Annals of Botany* 87: 303-311, 2001.
- HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. Brasília: EMBRAPA, 542 pp, 1994.
- JANOS, D. P. Mycorrhizas, succession, and the rehabilitation of deforested lands in the humid tropics. In: Fungi and environmental change. Frankland, J.C.; Magan, N.; Gadd, G.M. (eds.). *British Mycological Society Symposium*. Cambridge: Cambridge University Press, 20:129-162, 1996.
- JIA, Y.; GRAY, V. M.; STRAKER, C. J. The influence of *Rhizobium* and arbuscular mycorrhizal fungi on nitrogen and phosphorus accumulation by *Vicia faba*. *Annals of Botany* 94:252-258, 2004.
- JORDAN, C. F. Nutrient cycling processes and tropical forest management. In: GOMEZ-POMPA, A.; WHITMORE, T. C.; HADLEY, M. (ed). Rain forest regeneration and management. Paris: The Parthenon Publishing Group, Pp.159-179, 1991.
- LI, X. L.; GEGORGE, E.; MARSCHNER, H. Extension of the phosphorus depletion zone in VA-mycorrhizal white clover in a calcareous soil. *Plant and Soil* 136:41-48, 1991.
- MACEDO, A. C. *Revegetação: matas ciliares e de proteção ambiental*. São Paulo: Fundação Florestal, 24 pp, 1993.
- MARQUES, M. S.; PAGANO, M.; SCOTTI, M. R. M. M. L. Dual inoculation of a woody legume (*Centropium tomentosum*) with rhizobia and mycorrhizal fungi in south-eastern Brazil. *Agroforestry Systems* 52:107-117, 2001.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico. In Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O. (eds). *Microbiologia e Bioquímica do solo*. Universidade Federal de Lavras, 625 pp, 2002.

- MUNOZ, A.; PIEDRAS, P.; AGUILAR, M.; PINEDA, M. Urea is a product of ureidoglycolate degradation in chickpea. Purification and characterization of the ureidoglycolate urea-lyase. *Plant Physiology* 125:828-834, 2001.
- NEUMANN, E.; GEORGE, E. Extraction of extraradicular arbuscular mycorrhizal mycelium from compartments filled with soil and glass beads. *Mycorrhiza* 15:533-537, 2005.
- NOGUEIRA, M. A. Interações entre micorriza arbuscular, rizobactérias, fósforo e silício na manifestação da toxidez de manganês em soja. Tese (Doutorado), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 195 p, 2001.
- NOGUEIRA, M. A.; CARDOSO, E. J. B. N. Colonização radicular e produção de micélio externo por duas espécies de fungos micorrízicos arbusculares em soja. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 24:329-338, 2000.
- PATREZE, C. M.; CORDEIRO, L. Nitrogen-fixing and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbioses in some tropical legume trees of tribe Mimoseae. *Forest Ecology and Management* 196:275-285, 2004.
- PAUL, E. A.; CLARK, F. E. *Soil microbiology and Biochemistry*. Academic Press, INC. USA, 1989.
- PAULA, M. A.; SIQUEIRA, J. O.; OLIVEIRA, L. H.; OLIVEIRA, E. Efetividade simbiótica relativa em soja de populações de fungos endomicorrízicos nativos e de isolados de *Glomus macrocarpum* e *Gigaspora margarita*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 12:25-31, 1988.
- PEREIRA, E. G.; SIQUEIRA, J. O.; CURI, N.; MOREIRA, F. M. S.; PURCINO, A. A. C. Efeitos na micorriza e do suprimento de fósforo na atividade enzimática e na resposta de espécies arbóreas ao nitrogênio. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 8:59-65, 1996.
- RODRIGUES, L. A.; MARTINS, M. A.; SALOMÃO, M. S. M. B. Use of mycorrhizas and rhizobium in intercropping system of eucalyptus and sesbania. I – Growth, uptake and transfer os nitrogen between plants. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 27: n.4, 2003.
- ROLDAN, Á.; DÍAZ, G.; ALBALADEJO, J. Effect of VAM-fungal inoculation on growth and phosphorus uptake of two Hedysarum species in a Xeric Torrorthent soil from southeast Spain. *Arid Soil Reserch Rehabilit* 6:33-39, 1992.
- SCHIAVO, J.; MARTINS, M. A. Produção de mudas de acácia colonizadas com micorrizas e rizóbio em diferentes recipientes. *Pesquisa agropecuária Brasileira* 38:173-178, 2003.

- SIQUEIRA, J. O.; COLOZZI-FILHO, <sup>a</sup>; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; GUIMARÃES, P. T. G.; OLIVEIRA, E. Crescimento de mudas e produção do cafeeiro sob influência de fungos micorrízicos e superfosfato. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 17:53-60, 1993.
- SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, M. F. S.; GRISI, B. M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. Brasília: Embrapa/CNPAF/CNPSo, 142 pp, 1994.
- SIQUEIRA, J. O.; CARNEIRO, M. A. C.; CURI, N.; ROSADO, S. C. S.; DAVIDE, A. C. Mycorrhizal colonization and mycotrophic growth of native woody species as related to successional groups in southeastern Brazil. *Forest Ecology Management* 107:241-252, 1998.
- SYLVIA, D.M. Quantification of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Methods in Microbiology* 24:54-65, 1992.
- THRALL, P. H.; MURRAY, B. R.; WATKIN, E.; WOODS, M.; BAKER, K.; BURDON, J. J.; BROCKWELL, J. Bacterial partnerships enhance the value of native legumes in revegetation and rehabilitation of degraded agricultural. *Ecological Management and Restoration* 2:233-235, 2001.
- THRALL, P. H.; MILLSOM, D. A.; JEAUVONS, A. C.; WAAYERS, M.; HARVEY, G. R.; BAGNALL, D. J.; BROCKWELL, J. Seed inoculation with effective root-nodule bacteria enhances revegetation success. *Journal of Applied Ecology* 42:740-751, 2005.
- TORO, M.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (<sup>32</sup>P) and nutrient cycling. *Applied and Environmental Microbiology* 63:4408-4412, 1997.
- VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255:571-586, 2003.
- WALKER, T. S.; BAIS, H. P.; GROTEWOLD, E.; VIVANCO, J. M. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology* 132:44-51, 2003.
- WELLER, D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26: 379-407, 1988.
- XAVIER, L. J. C.; GERMIDA, J. J. Response of lentil under controlled conditions to co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia varying in efficacy. *Soil Biology & Biochemistry* 34:181-188, 2002.
- XAVIER, L. J. C.; GERMIDA, J. J. Selective interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* enhance pea yield and nutrition. *Biology and Fertility of Soils* 37:261-267, 2003.

- ZANGARO, W.; ANDRADE, G. Micorrizas arbusculares em espécies arbóreas nativas da bacia do rio Tibagi. Pp. 171-210 in: Medri, M. E.; Bianchini, E.; Shibatta, O. A. & Pimenta, J. A. (eds.). *A bacia do rio Tibagi*. Edição dos Editores, Londrina, 2002.
- ZANGARO, W. Micorrizas arbusculares em espécies arbóreas nativas da bacia do Rio Tibagi (PR) e suas relações com os grupos sucessionais. Tese (Doutorado), Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 155pp, 1997.
- ZANGARO, W.; BONONI, V. L. R.; TRUFEN, S. B. Mycorrhizal dependency, inoculum potential and habitat preference of native woody species in South Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 16:603-622, 2000.
- ZANGARO, W.; NISIZAKI, S. M. A.; DOMINGOS, J. C. B.; NAKANO, E. M. Mycorrhizal response and successional status in 80 woody species from south Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 19:315-324, 2003.
- ZANGARO, W.; NISHIDATE, F. R.; CAMARGO, F. R. S.; ROMAGNOLI, G. G.; VANDRESSEN, J. Relationships among arbuscular mycorrhizas, root morphology and seedling growth of tropical native woody species in southern Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 21:529-540, 2005.

1 **Number of text pages:** 20

2 **Figures:** 8

3 **Running Title:** Arbuscular mycorrhiza, rhizobacteria and woody legume.

4 **Authors:** Gisele Milani Lovato<sup>1</sup>, Marco A. Nogueira<sup>2,\*</sup>, Adriana Knob<sup>1</sup>, Dáfila Santos

5 Lima<sup>1</sup>, Flávia R. Spago de Camargo<sup>1</sup>, Letícia S. Murate<sup>1</sup>, Marina Y.H. Myiauchi<sup>1</sup>,

6 Tadeu Goulart<sup>2</sup>, Waldemar Zangaro<sup>3</sup>, Arnaldo Colozzi-Filho<sup>4</sup> & Galdino Andrade<sup>2</sup>.

7

8 <sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina.

9 <sup>2</sup> Universidade Estadual de Londrina, CCB/Depto. de Microbiologia. Caixa Postal 6001

10 CEP 86051-990 Londrina PR Brazil.

11 Phone/fax: 55 43 3371 4791

12 E-mail: [nogueira@uel.br](mailto:nogueira@uel.br)

13 \* Corresponding Author.

14 <sup>3</sup> Universidade Estadual de Londrina, CCB/Depto. de Biologia Animal e Vegetal.

15 <sup>4</sup> Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Londrina PR.

16

16 **INTERACTIONS BETWEEN ARBUSCULAR MYCORRHIZA AND RHIZOBACTERIA ON**  
17 **NATIVE WOODY LEGUMINOUS TREES USEFUL IN REFORESTATION**

18

19 *Key words: Gigaspora, Glomus, Biological Nitrogen Fixation, P uptake, Rhizobium,*  
20 *Synergism.*

21

22 **Abstract**

23 Many areas previously covered with native forests are abandoned due to decrease on  
24 soil fertility as consequence of soil degradation. Revegetation of degraded areas may be  
25 expensive due to costs involved in plantlets production, installation and fertilization.  
26 Thus, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and rhizobacteria, not only N-fixing but also  
27 plant growth promoter, are good candidates to improve plant capacity to establish in  
28 degraded and low-fertility soils. Accordingly, the aim of this work was identify the most  
29 efficient interaction(s) between AMF (*Glomus clarum*, *Glomus etunicatum*, *Glomus*  
30 *intraradices* or *Gigaspora margarita*) and rhizobacteria on the plantlets productions of  
31 four woody leguminous trees (*Enterolobium contortisiliquum*, *Peltophorum dubium*,  
32 *Anadenanthera colubrina* and *Parapiptadenia rigida*) native from the Brazilian Atlantic  
33 Forest and employed in reforestation programs. The experimental design was entirely  
34 randomized in a 5x2 factorial arrangement (four AMF species and non-AMF control)  
35 with and without rhizobacteria in four replications, for each plant species and three  
36 harvesting time. The AMF species *G. clarum* and *G. margarita* improved all plant  
37 species growth and nodulation in two species, what generally coincided with a better P  
38 nutritional status. These most effective AMF also produced higher amounts of external  
39 hyphae. The double inoculation rhizobacteria-AMF increased plant height, and also N  
40 concentration and N accumulated in shoots in the most effective interactions.

41 Rhizobacteria stimulated mycorrhizal root colonization in some plant species and was  
42 deleterious in others but had no effect on the external hyphae length. Effective microbial  
43 interactions improve the plantlet precocity, which can be transplanted earlier to the  
44 field. Nevertheless, an effective interaction between AMF and rhizobacteria depend on  
45 the host plant and also on the environment, what reinforces the need for previous  
46 screening to find the best plant-microbes interactions in order to be employed in  
47 reforestation programs.

48

## 49 **Introduction**

50 Environmental degradation is a worldwide increasing concern. The substitution  
51 of native forest for pastures, cropping or even wood exploration results, in many cases,  
52 in soil degradation (Thrall et al., 2005). One of the consequences of soil degradation is  
53 the decrease of soil organic matter. As a result, soil fertility, structural stability, water  
54 holding capacity and microbial activity are also reduced (Caravaca et al., 2003). The  
55 consequences are lower soil capacity in supplying water and nutrients for plants. In this  
56 case, the area becomes more dependent on external inputs, such as chemical fertilizers,  
57 which bring not only economical, but sometimes environmental costs as well.

58 The use of native woody leguminous trees for soil reclamation contributes to  
59 reduce the environmental impacts and improve the preservation of biodiversity  
60 (Carneiro et al., 1998; Marques et al., 2001). Most of these plants, mainly those from  
61 Mimoseae family (Patreze and Cordeiro, 2004), are useful due to its fast growth, high  
62 biomass production, adaptation to unfavorable soil and weather conditions, and ability  
63 in forming symbioses with helpful soil microorganisms (Schiavo and Martins, 2003).

64 The use of microorganisms as biofertilizers (Vessey, 2003) improves the  
65 morphophysiological quality of seedlings and contributes to reduce the economical and

66 environmental costs during reforestation. According to Thrall et al. (2005), plant  
67 interactions with soil microorganisms able to form symbiosis are crucial for  
68 reforestation of degraded areas. Especially in low-P soils, most of plant species depend  
69 on mycorrhizal symbiosis (Jia et al., 2004) for mining P from soil. The improved P  
70 uptake in plants associated to arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) is due to a greater  
71 soil volume explored by the external mycelium, which can extend up to 11 cm away  
72 from the root surface (Li et al., 1991) and amount up to 100 m g<sup>-1</sup> of soil (Miller et al.,  
73 1995). This surprising amount of external hyphae also contributes to improve the  
74 stability of soil aggregates (Dodd et al., 2000). Other benefits, such as improved  
75 resistance to drought and improved N uptake are also observed, mainly in leguminous  
76 plants (Barea et al., 2002; Caravaca et al., 2003).

77 Woody leguminous trees able to simultaneously form symbiosis with *Rhizobium*  
78 and AMF are good candidate to be used in reforestation programs (Franco and Faria,  
79 1997). In this case, plants usually have improved growth, N and P uptake, nodulation,  
80 biological nitrogen fixation, higher levels of mycorrhizal colonization, resistance to soil-  
81 born pathogens and improved phosphate solubilization in soil (Marques et al., 2001;  
82 Xavier and Germida 2001; Xavier and Germida, 2003). The benefits from the double-  
83 symbiosis reduce the costs with N and P fertilizers (Burity et al., 2000) and improve the  
84 plantlets establishment, growth and survival after transplanting to the field (Marques et  
85 al., 2001).

86 Besides *Rhizobium* and AMF, other microorganisms may also benefit plants by  
87 means of free-living nitrogen fixation, phosphate solubilization or phytohormones  
88 production (Artursson et al., 2006). Some of these microorganisms are bacteria so-  
89 called plant-growth promoting rhizobacteria (PGPR) (Artursson et al., 2006;

90 Dobbelaere et al., 2003) and are able to stimulate plant growth mainly due to  
91 phytohormones production.

92 Despite the benefits of microbial interactions on plant growth, a limitation in  
93 degraded areas is generally the low potential of natural inoculum of beneficial  
94 microorganisms (Carneiro et al., 1998). Moreover, although AMF colonizes most of  
95 vascular plants, not all species, and even isolates, are effective in improving plant  
96 growth (Dodd et al., 2000). This make necessary previous screening for effective AMF  
97 to be employed in inoculation programs, mainly when plantlets are produced in nursery.

98 The objective of this work was to identify the most effective interaction(s)  
99 among four native woody leguminous trees with four AMF species when co-inoculated  
100 or not with rhizobacteria, during the initial phase of plantlet formation.

101

## 102 **Materials and Methods**

103

### 104 *Substrate*

105 The substrate for plant growth was obtained by mixing three parts of a top-layer  
106 (0-20 cm) of an acidic, low-natural fertility sandy oxisol, with one part of washed river  
107 sand. The objective of the sandy substrate was to make easy the extraction of  
108 mycorrhizal external mycelium. Two kg of the mixture was added to plastic pots that  
109 were wrapped hermetically with plastic sheets and fumigated with methyl bromide for  
110 one week. Afterwards, pots were allowed to stand in open air in order to remove the  
111 fumigant residues. The chemical analysis of the substrate showed the following results:  
112 pH (CaCl<sub>2</sub>) 4.5; C 11.04 g dm<sup>-3</sup>; P 2.0 mg dm<sup>-3</sup>; Al<sup>3+</sup> 0.57 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; H+Al 5.34 cmol<sub>c</sub>  
113 dm<sup>-3</sup>; Ca<sup>2+</sup> 1.3 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mg<sup>2+</sup> 0.78 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; K<sup>+</sup> 0.05 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; CEC 7.47 cmol<sub>c</sub>  
114 dm<sup>-3</sup> and bases saturation (V) 28.51%.

115

116 *Biological material*

117 Four woody leguminous trees, native from the Brazilian Atlantic Forest, and  
118 used for reforestation programs, were tested. Three of them belong to the Mimoseae  
119 family and are noduliferous: *Anadenanthera colubrina* (early secondary), *Enterolobium*  
120 *contortisiliquum* (late secondary), *Parapiptadenia rigida* (early secondary). The last  
121 tree, *Peltophorum dubium* (late secondary), belongs to the Caesalpinioideae family and  
122 is non-noduliferous. Seeds of each species were surface-sterilized with 70% ethanol for  
123 5 min, 2% sodium hypochlorite for 5 min and rinsed several times with distilled water.  
124 Then, seeds were pre-germinated in trays containing autoclaved sand. Before sowing, *E.*  
125 *contortisiliquum* seeds were put into boiling water, and left to stand in the same water  
126 for 24 h in order to break dormancy. Six days after sowing of *E. contortisiliquum* and *P.*  
127 *dubium*, and 10 days after sowing of *A. colubrina* and *P. rigida*, plantlets were  
128 transplanted to the pots.

129 The AMF inocula (*Glomus clarum*, *Glomus etunicatum*, *Glomus intraradices* or  
130 *Gigaspora margarita*) were multiplied previously in *Brachiaria decumbens* in pure  
131 culture. Before transplanting, pots respective to each treatment received 2 g of soil-  
132 inoculum, containing spores, hyphae and colonized roots. The non-AMF control pots  
133 also received 2 g of the same soil, but free from AMF.

134 The *Rhizobium* strains were kindly supplied by Embrapa-Agrobiologia. The  
135 plants from Mimoseae family were inoculated with two strains: *A. colubrina* was  
136 inoculated with the strains B9001 and BR9004; *E. contortisiliquum*, BR4406 and  
137 BR4407; and finally *P. rigida*, BR827 and BR9002. The only species from  
138 Caesalpinioideae, *P. dubium*, was inoculated with the isolated LEM B6, a PGPR  
139 isolated and kept at the Laboratory for Microbial Ecology (CCB/Dept. of

140 Microbiology/UEL) and identified as *Burkholderia* sp. (Albino, 2004). Prior to  
141 inoculation, the rhizobial strains were grown in TY medium (Tryptone 5 g, yeast extract  
142 3 g, CaCl<sub>2</sub> 0.5 g; agar 15 g, distilled water 1000 mL), while the isolated B6 was  
143 cultivated in Nfb medium (Döbereiner and Day, 1976). All strains were incubated in  
144 BOD at 28°C for 3 to 5 days. After growth, each strain was resuspended in 0.85% saline  
145 and the cell concentration adjusted spectrophotometrically at 660 nm. Each plantlet  
146 received at least 10<sup>10</sup> cells 30 days after transplanting.

147

#### 148 *Experimental design and statistical analysis*

149 The experiments, for each plant species, were entirely randomized in a 5x2  
150 factorial. The first factor was AMF (non-AMF control and four AMF species) and the  
151 second was rhizobacteria presence or absence, in four replications. Plants were watered  
152 when necessary with tap water and received weekly 10 mL of Hewitt's nutritive  
153 solution (Hewitt, 1966) for leguminous, with P content reduced to 1/5. The experiments  
154 were conducted under greenhouse from September 2004 to May 2005. Plant height was  
155 measured weekly, while plant biomass (dry weight at 60°C/48h), root length  
156 (Newmann, 1966), and number nodule were assessed at approximately 130, 160 and  
157 190 days after the rhizobacteria inoculation. In the last harvesting, roots were assessed  
158 for percent AMF root colonization (Phillips and Hayman, 1970; Giovannetti and Mosse,  
159 1980), the total external mycelium was estimated in the substrate (Andrade et al., 1997),  
160 and N (Sarruge and Haag, 1974) and P (Murphy and Riley, 1962) were assessed in  
161 shoots. Plants from the second harvest were also analyzed for ureide contents (Hungria  
162 and Neves, 1987; Herridge, 1990) in relation to nitrate (Cataldo et al., 1975) in the dry  
163 shoot biomass.

164 Each harvesting time was considered a single experiment. The data were  
165 submitted to ANOVA with F test ( $p < 0.05$ ) and the averages compared by means of  
166 Duncan's test ( $p < 0.05$ ) by using the statistical software SAS (SAS, 1991).

167

## 168 **Results**

169

### 170 *Plant growth*

171 The initial plant response to the symbioses varied according to plant species  
172 (Figure 1). AMF effects started between 30 and 90 days, depending on the host and on  
173 the AMF. The most effective AMF were *G. clarum* and *G. margarita*, depending on the  
174 plant species, followed by *G. etunicatum*. Plants inoculated with *G. intraradices*  
175 generally showed growth similar to the non-AMF control. The response to rhizobacteria  
176 was less expressive, started later than to AMF, and generally occurred in the more  
177 effective AMF associations. In the non-effective mycorrhizal interactions, such as *G.*  
178 *intraradices* in *P. dubium*, the co-inoculation with rhizobacteria caused reduction in  
179 plant height.

180 There was single effect of AMF on shoot and root dry weights ( $P < 0.001$ ) in each  
181 plant species (Figure 2). Similarly to plant height, *G. clarum* and *G. margarita* were the  
182 most efficient AMF in improving plant biomass. *G. etunicatum* significantly increased  
183 plant biomass only when associated to *A. colubrina*. *G. intraradices* was ineffective in  
184 all hosts, while the rhizobacteria effect on plant biomass was also non-significant.  
185 Mycorrhiza also improved total root length ( $P < 0.001$ ), mainly *G. clarum*, followed by  
186 *G. margarita* (Figure 3). The rhizobacteria effects on this variable was also non-  
187 expressive.

188

189 *Microbial parameters*

190 Nodules were observed in *A. colubrina* and *E. contortisiliquum* since the first  
191 harvesting time (Figure 4). In *A. colubrina*, nodulation occurred only when plants were  
192 also associated with *G. clarum*, *G. etunicatum* and *G. margarita*. *E. contortisiliquum*  
193 nodulated when associated to all AMF and even some non-inoculated treatments also  
194 presented some nodules, especially in the most effective mycorrhizal symbioses. *P.*  
195 *rigida*, although recognized as noduliferous, did not show nodules in any treatment.

196 The mycorrhizal root colonization varied from 0 to 79% according to AMF  
197 species and was also influenced by rhizobacteria (Figure 5). The highest colonization  
198 levels were found in all plants associated to *G. clarum* and *G. margarita*. In three out of  
199 four hosts, the rhizobacteria stimulated *G. clarum* colonization, resulting in significant  
200 interaction between AMF and rhizobacteria ( $P < 0.001$ ). On the other hand, the  
201 rhizobacteria stimulated *G. margarita* root colonization only when associated to *A.*  
202 *colubrina*, while in the other hosts, rhizobacteria caused decrease in root colonization.  
203 For the less effective AMF species (*G. intraradices* and *G. etunicatum*), the  
204 rhizobacteria also decreased the root colonization, when associated to *E.*  
205 *contortisiliquum* and *P. dubium*.

206 AMF influenced significantly ( $P < 0.001$ ) the amount of total external hyphae in  
207 the substrate, with no effect of rhizobacteria (Figure 6). The AMF that most produced  
208 external hyphae were *G. margarita* and *G. clarum* in all host plants. *G. margarita*  
209 produced higher amounts of external hyphae than *G. clarum* when associated to *A.*  
210 *colubrina* and *P. dubium*. Considering the host *P. rigida*, *G. clarum* produced the  
211 highest amounts of external hyphae. Only in this host plant, *G. intraradices* and *G.*  
212 *etunicatum* produced more external hyphae than found in the non-AMF control.  
213 Although not compared statistically, the host plant seemed to influence the external

214 hyphae production. The highest figures were found in *E. contortisiliquum* and *P.*  
215 *dubium*, followed by *A. colubrina* and *P. rigida*.

216

### 217 *Nitrogen and phosphorus contents*

218       Except for *P. rigida*, the interaction between AMF and rhizobacteria was  
219 significant for N concentration in the plants (Figure 7). In general, N concentration  
220 decreased in the most effective AMF interactions, as a consequence of dilution effect.  
221 For *A. colubrina*, the effect of rhizobacteria was very evident in the most effective AMF  
222 interactions, resulting in higher N concentrations. For the other hosts, there was no  
223 effect of rhizobacteria in each AMF treatment. Conversely, when considering the total  
224 N accumulated in the shoots, all host plants showed higher N accumulated when  
225 associated with *G. clarum* and *G. margarita*. This increase was still more pronounced in  
226 *A. colubrina* and *E. contortisiliquum* when inoculated with rhizobacteria.

227       P concentration in the shoots increased significantly in the AMF-plants when  
228 compared to the non-AMF-plants, mostly when associated to *G. clarum* and *G.*  
229 *margarita* (Figure 8). There was no effect of rhizobacteria on P concentration. *A.*  
230 *colubrina* showed the highest concentration, especially when associated with *G.*  
231 *margarita*. *E. contortisiliquum* showed the lowest P concentration in relation to the  
232 other species.

233       The ureide-N assessed in the shoot dry biomass from noduliferous plant was  
234 little expressive and did not differ among treatments. The averages for each plant  
235 species were: *A. colubrina* 2.41%, *P. rigida* 2.83% and *E. contortisiliquum* 3.41% (not  
236 shown).

237

## 238 **Discussion**

239

240 *Microbial effects on plant growth*

241           The four woody leguminous species benefited mainly from two AMF species  
242 and, less extensively, from rhizobacteria. In this case, plant response to rhizobacteria  
243 was observed only after AMF stimulated plant growth. In general, the more effective  
244 AMF was, the earlier rhizobacteria contributed to plant height. Even for the non-  
245 noduliferous species, *P. dubium*, the rhizobacteria stimulated its height when associated  
246 to *G. clarum*. Similarly, Burity et al. (2000) observed stimulus on *Mimosa*  
247 *caesalpinifolia* height when associated to *Rhizobium* and arbuscular mycorrhiza,  
248 emphasizing the importance of microbial symbiosis on plant growth. Conversely,  
249 Schiavo and Martins (2003) did not observe AMF and *Rhizobium* effects on *Acacia*  
250 *mangium* height. The authors attributed the non-response to the small volume of the  
251 pots used for plant growth.

252           Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and AMF may interact  
253 synergistically on plant growth, as a result of improved nutrient acquisition or  
254 production of phytohormones (Artursson et al., 2006). In our case, inoculation with *G.*  
255 *clarum* and *G. margarita* stimulated significantly the shoot and root biomasses and total  
256 root length. The inoculation with *G. etunicatum* resulted in lower response, while *G.*  
257 *intraradices* usually did not affect plant growth. AMF are generally not specific for host  
258 colonization. Different AMF species or even isolates have different effects onto host  
259 plant (Barea et al., 2002). These results strengthen the need for screening an efficient  
260 mycorrhizal symbiosis for a successful plant growth in a low-fertility soil (Caravaca et  
261 al., 2003). The better growth of mycorrhizal plants is also result of an increase of P  
262 uptake (Neumann and George, 2005) by means of the external hyphae. Moreover, the  
263 higher total root length increase in the efficient mycorrhizal associations also result in

264 higher degree of root branching (Berta et al., 1994), in addition to mycorrhizal external  
265 hyphae, increasing the surface for P uptake.

266

### 267 *Mycorrhizal effects on nodulation*

268         The mycorrhizal stimulus to nodulation in *A. colubrina* and *E. contortisiliquum*  
269 strengthens the importance of the tripartite symbiosis *Rhizobium*-mycorrhiza-  
270 leguminous species. In fact, several other works have emphasized that nodulation and  
271 biological nitrogen fixation are increased in mycorrhizal plants, as consequence of a  
272 synergistic effect (Burity et al., 2000; Xavier and Germida, 2002; Barea et al., 2002; Jia  
273 et al., 2004). The increase in nodulation in mycorrhizal plants is generally attributed to a  
274 more intense metabolism (Burity, 2000) as a result of a better nutritional status of the  
275 host plant, especially in relation to P. Conversely, in some situations, the double  
276 inoculation with *Rhizobim* and AMF is unfavorable for plants. Schiavo and Martins  
277 (2003) found that the number of nodules in *A. mangium* decreased when plants were  
278 also inoculated with AMF. In this case, the reduction in nodulation was attributed to a  
279 competition between the symbionts for plant photoasimilates, under limiting conditions.  
280 In our case, although considered noduliferous, *P. rigida* did not have nodulation in any  
281 treatment. Some factors such as P deficiency may limit nodulation (Frioni et al., 1998).  
282 However, plants associated to *G. clarum* and *G. margarita* had expressive growth in  
283 relation to the non-mycorrhizal ones, attributed to a better P nutrition, in fact higher in  
284 these plants. Other factors, such as low pH and high Al availability in the soil, as the  
285 case, are also restrictive to BNF. In this case, the bacterial isolate used for this species  
286 may be more sensitive to these factors and thus not able to survive and colonize plant  
287 roots. On the other hand, *E. contortisiliquum* showed to be more susceptible to rhizobial  
288 infection and nodulation, because even in a lower extent, the non-inoculated controls

289 showed nodulation. Dust and the non-sterilized water used for watering are the probable  
290 sources of *Rhizobium* that nodulated *E. contortisiliquum* controls. However, *A.*  
291 *colubrina* showed nodules only when inoculated with the rhizobial strains, probably due  
292 to more specificity between host and bacteria.

293

#### 294 *Rhizobacteria effects on mycorrhizal colonization*

295         The levels of mycorrhizal root colonization in plants are variable and depend on  
296 the interaction host-environment-endophyte (Zangaro et al., 2003; Patreze and Cordeiro,  
297 2004). The main factor affecting mycorrhizal root colonization is generally soil P  
298 availability. Usually, the lower P availability, the greater is mycorrhizal root  
299 colonization. In our case, mycorrhizal root colonization varied according to AMF  
300 species and rhizobacteria, which stimulated mycorrhizal colonization in some cases, and  
301 decreased in other. Burity et al. (2000) and Schiavo and Martins (2003) also observed  
302 increase in root colonization in *Rhizobium*-inoculated plants. Root hair exudates  
303 substances derived from photoassimilates, generally amino acids, organic acids, sugars,  
304 mucilage, proteins and flavonoids. The latter may attract fungal hyphae towards the root  
305 surface, increasing root colonization (Walker et al., 2003). Any factor affecting plant  
306 physiology will probably also affect the AMF associated. In this case, the inoculation of  
307 rhizobacteria may affect positively or negatively the mycorrhizal colonization due to  
308 effects on the host plant physiology. Indeed, *G. clarum* colonization was stimulated in  
309 three hosts, while *G. margarita* was stimulated only in *A. colubrina* and reduced in the  
310 other hosts. In the host *P. rigida*, both AMF had the root colonization decreased.

311         Bacteria that stimulate mycorrhizal root colonization are named “helper  
312 bacteria” (Balota et al., 1995). According to Artursson et al. (2006), there are many  
313 reports about stimulation of mycorrhizal colonization due to rhizobacteria. These soil

314 bacteria are able to produce organic compounds, probably phytohormones, which  
315 increase root cell permeability and exudation, what stimulate the mycorrhizal infection  
316 process (Barea et al., 2002). In our case, the increase in mycorrhizal root colonization in  
317 some *Rhizobium*-inoculated plants is probably result of better N nutritional status of the  
318 host plant. However, the stimulation of *G. clarum* in the non-noduliferous *P. dubium*  
319 inoculated with the isolate B6 may be attributed to production of amino acids, vitamins  
320 or growth substances (e.g. indoleacetic acid) by bacteria (Vivas et al., 2003). As  
321 observed from these data, the stimulation or suppression of mycorrhizal root  
322 colonization depends on the interaction rhizobacteria-host-AMF.

323         The external hyphae followed the same tendency as mycorrhizal root  
324 colonization in which *G. clarum* and *G. margarita* presented the highest figures, but  
325 without rhizobacteria effects. Besides helping the plant mining P from soil, the external  
326 hyphae contributes to improve soil aggregates stability and, consequently, resistance to  
327 erosion (Barea et al., 2002) and are also source of mycorrhizal inoculum (Newman and  
328 George, 2005). These characteristics are of particular interest in degraded area, usually  
329 susceptible to erosion and poor in mycorrhizal inoculum. The production, propagation  
330 and longevity of external hyphae are also variable with AMF species (Dodd et al.,  
331 2000), what may affect their ability for P uptake and, consequently, the mycorrhizal  
332 effectiveness. It must be considered that the external hyphae found in the non-AMF  
333 treatments may be originated from other filamentous fungi in the soil and also the  
334 hyphae originated from native AMF before the fumigation of the substrate.

335

### 336 *Nitrogen and phosphorus contents*

337         The fact that plants associated to more effective AMF showed less N  
338 concentration is result of a dilution effect in more developed plants (Jarrel and Beverly,

339 1981). However, when considering the total N accumulated in the shoots, the  
340 mycorrhizal plants had higher amounts in the most of the cases. This effect was still  
341 more pronounced when plants were also inoculated with rhizobacteria, even the non-  
342 noduliferous plants, showing a synergistic effect between AMF and rhizobacteria on N  
343 uptake. In the case of non-noduliferous plants, the AMF can help plant uptake N from  
344 soil (Pereira et al., 1996). However, in some cases, the rhizobacteria are also free-living  
345 N-fixers. Indeed, the bacterial isolate B6 inoculated in this plant have *nif* genes (Albino,  
346 2004). The increase of BNF in mycorrhizal plants is attributed to an improved P supply  
347 that enables the host plant better conditions for supplying ATP to the biological nitrogen  
348 fixation, a high energy-demanding process (Barea et al., 2002; Arturson et al., 2006).  
349 Similar results were also found in *Mimosa caesalpinifolia* (Burity et al., 2002) and *A.*  
350 *mangium* plantlets (Schiavo and Martins, 2003).

351         In the majority of the cases, the AMF, mainly *G. clarum* and *G. margarita*,  
352 increased P concentration in plants, but without effects of rhizobacteria. Previous work  
353 showed that the co-inoculation of AMF and rhizobacteria stimulated P concentration in  
354 plants (Albino, 2004). Similarly, many other works have also showed increase in P  
355 concentration in woody plants due to AMF (Schiavo and Martins, 2003; Caravaca et al.,  
356 2003; Jia et al., 2004). It is noteworthy that not all AMF succeeded in effectively  
357 colonize the host and improve its P uptake and growth, although AMF are recognized as  
358 not specific in colonizing their hosts. Many factors may be related to this unsuccessful  
359 symbiosis, such as incompatibility whit the environment, especially the substrate, or  
360 even spore dormancy.

361

362 *Concluding remarks*

363 In summary, the double inoculation with AFM and rhizobacteria in woody  
364 leguminous trees improve plant growth mainly due to a better P and N nutritional status  
365 in an effective symbiosis. Not all mycorrhizal associations are effective in improving  
366 plant growth and nutritional status, what reinforces the need for a previous screening in  
367 each AMF-host-environment to find the best interaction. Once found the best  
368 combination, the effective microbial symbioses may play an important role in plantlets  
369 production in nursery by improving its precocity. When transplanted to the field, these  
370 plants are expected to have an improved capacity of establishment on degraded, low-  
371 fertility, and with low-microbial inoculum soils.

372

### 373 **Acknowledgements**

374 We greatly thank Dr. Rosa Pitard (Embrapa Agrobiologia, Seropédica RJ) for providing  
375 the *Rhizobium* strains; Dr. Elke J.B.N. Cardoso (Escola Superior de Agricultura “Luiz  
376 de Queiroz”) for providing some of the initial mycorrhizal isolates and M.Sc. Alba  
377 Lúcia Cavalheiro (UEL/CCB/BAV) for supplying the plant seeds. Thanks are also due  
378 to Marcio Ferreira Cruz for his support during installation and conduction of the  
379 experiments. This research was granted by Fundação Araucária (Project Number 03937  
380 CPG/UEL).

381

### 382 **References**

383 Albino U B 2004 Isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas associadas à  
384 planta carnívora *Drosera villosa* var. *villosa* e seu potencial como inoculante de  
385 plantas arbóreas nativas. Thesis (Doctoral), Universidade Estadual de Londrina, 92  
386 pp.

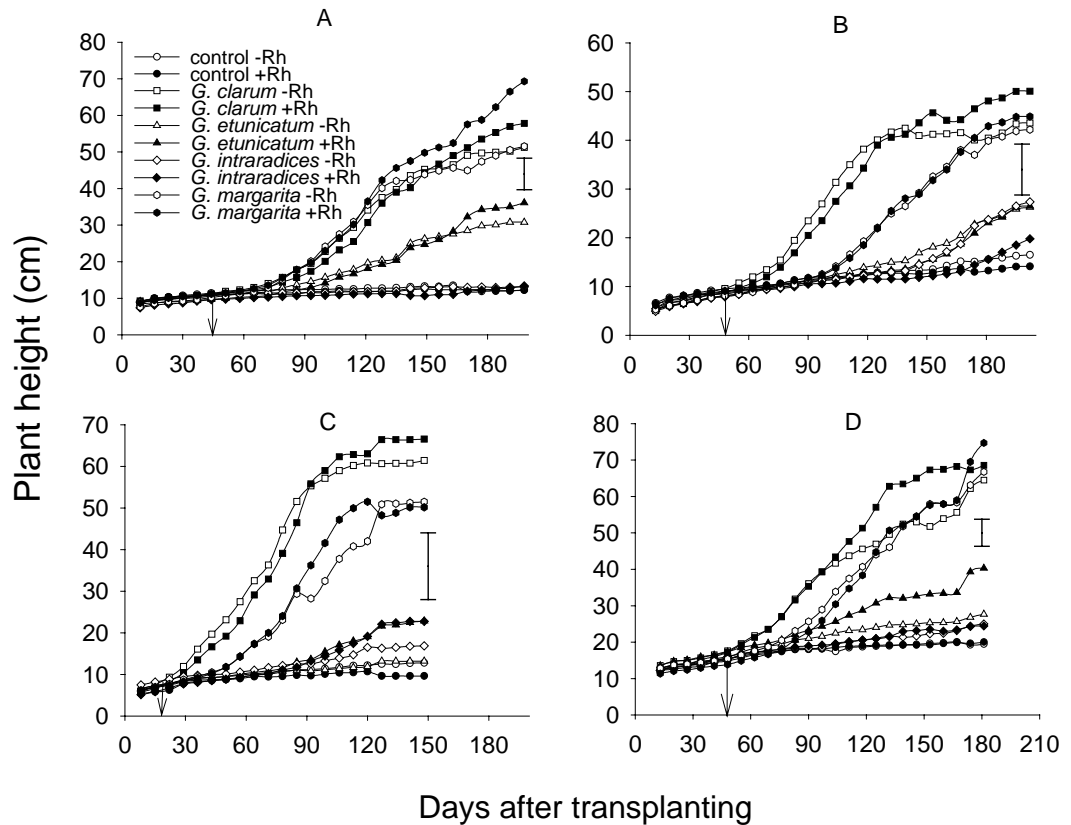
- 387 Andrade G, Mihara K L, Linderman, R G and Bethlenfalvay G J 1997 Bacteria from  
388 rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi. *Plant*  
389 *Soil* 192, 71-79.
- 390 Artursson V, Finlay R D and Jansson J K 2006 Interactions between arbuscular  
391 mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Env.*  
392 *Micróbio.* 8, 1-10.
- 393 Balota E L, Lopes E S, Hungria M and Dobereiner J 1995 Interações e efeitos  
394 fisiológicos de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na  
395 mandioca. *Pesq. Agropec. Brasileira* 30, 1335-1345.
- 396 Barea J M, Azcón R and Azcón-Aguilar C 2002 Mycorrhizosphere interactions to  
397 improve plant fitness and soil quality. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 343-351.
- 398 Berta G, Trotta A, Fusconi A, Hooker J E, Munro M, Atkinson D, Giovanetti M,  
399 Morini S, Fortuna P, Tisserant B, Gianinazzipearson V and Gianinazzi S 1994  
400 Arbuscular mycorrhizal induced changes to plant growth and root system  
401 morphology in *Prunus cerasifera*. *Tree Physiol.* 15, 281-293.
- 402 Burity H A, Lyra M C C P, Souza E S, Mergulhão A C E S and Silva M L R B 2000  
403 Efetividade da inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares em mudas  
404 de Sabiá submetidas a diferentes níveis de fósforo. *Pesq. Agropec. Brasileira* 35,  
405 801-807.
- 406 Caravaca F, Barea J M, Palenzuela J, Figueroa D, Alguacil M M and Roldán A 2003  
407 Establishment of shrub species in a degraded semiarid site after inoculation with  
408 native or allochthonous arbuscular mycorrhizal fungi. *App. Soil Ecol.* 22, 103-111.
- 409 Carneiro M A C, Siqueira J O, Moreira F M S, Carvalho D, Botelho S A and Junior O J  
410 S 1998 Micorriza arbuscular em espécies arbóreas e arbustivas nativas de ocorrência  
411 no sudeste do Brasil. *Cerne* 4, 129-145.

- 412 Cataldo D A, Haroon M, Schader L E and Youngs V L 1975 Rapid colorimetric  
413 determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Communication  
414 in Soil Sci. Pl. Anal. 6, 71-80.
- 415 Dobbelaere S, Vanderleyden J and Okon Y 2003 Plant growth-promoting effects of  
416 diazotrophs in the rhizosphere. Crit. Rev. Pl. Sci. 22, 107-149.
- 417 Dobereiner J and Day J M 1976 Associative symbiosis in tropical grasses:  
418 characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: Proceedings of  
419 the 1<sup>st</sup> Internacional Symposium on Nitrogen Fixation II. Washington State  
420 University Press pp. 518-538. Pulman, USA.
- 421 Dodd J C, Boddington C L, Rodriguez A, Conzalez-Chavez and Mansur I 2000  
422 Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from different genera: form,  
423 function and detection. Plant Soil 226, 131-151.
- 424 Franco A A and Faria S M 1997 The contribution of N<sub>2</sub>-fixing tree legumes to land  
425 reclamation and sustainability in the tropics. Soil Biol. Biochem. 29, 897-903.
- 426 Frioni L, Malatés D, Irigoyen I and Dodera R 1998 Promiscuity for nodulation and  
427 effectivity in the N<sub>2</sub>-fixing legume tree *Acacia caven* in Uruguay. Appl. Soil Ecol. 7,  
428 239-244.
- 429 Giovanetti M and Mosse B 1980 Evaluation of techniques for measuring vesicular-  
430 arbuscular micorrhizal infections in roots. New Phytol. 84, 489-500.
- 431 Herrige D F and Peoples M B 1990 Ureid assay for measuring nitrogen fixation by  
432 nodulated soybean calibrated by 15N methods. Plant Physiol. 93, 495-503.
- 433 Hewitt E J 1966 Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition,  
434 2nd ed. Farnham: Commonwealth Agricultural Bureaux.
- 435 Hungria M and Neves M C P 1987 Cultivar and *Rhizobium* strain effects on nitrogen  
436 fixation and transport in *Phaseolus vulgaris* L. Plant Soil 103, 111-121.

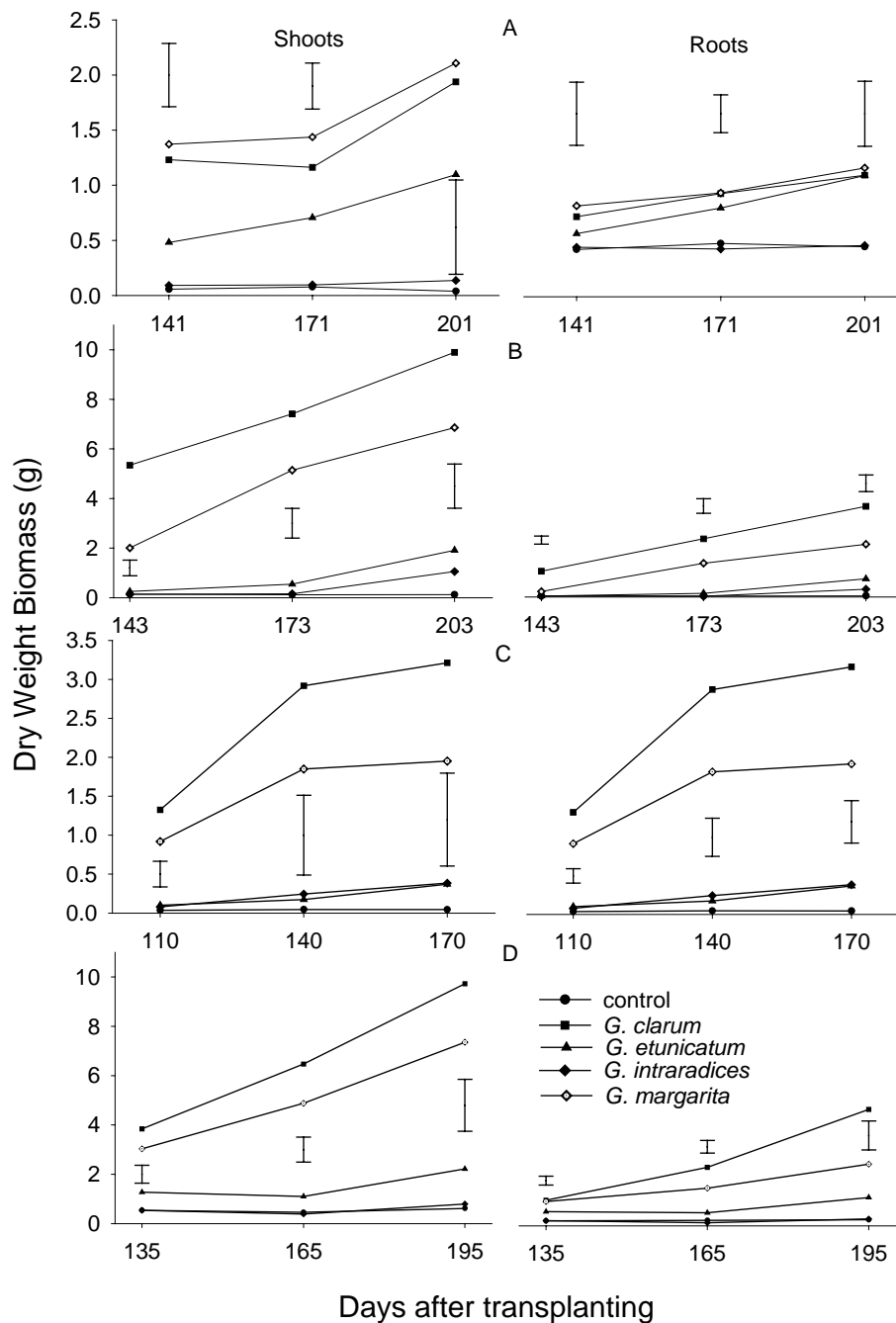
- 437 Jarrell W M and Beverly R B 1981 The dilution effect in plant nutrition studies. Adv.  
438 Agron. 34, 197-224.
- 439 Jia Y, Gray V M and Straker C J 2004 The influence of *Rhizobium* and arbuscular  
440 mycorrhizal fungi on nitrogen and phosphorus accumulation by *Vicia faba*. Ann.  
441 Bot. 94, 251-258.
- 442 Li X L, Gegorge E and Marshner H 1991 Extension of the phosphorus depletion zone  
443 in VA-mycorrhizal white clover in a calcareous soil. Plant Soil 136, 41-48.
- 444 Marques M S, Pagano M and Scotti M R M M L 2001 Dual inoculation of a woody  
445 legume (*Centrolobium tomentosum*) with rhizobia and mycorrhizal fungi in south-  
446 eastern Brazil. Agrof. Syst. 52, 107-117.
- 447 Miller R M, Reinhardt D R, Jastrow J D 1995 External hyphal production of vesicular-  
448 arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. Oecologia  
449 103, 17-23.
- 450 Murphy J and Riley J P 1962 A modified single solution method for the determination  
451 of phosphate in natural waters. Annal. Chim. Acta 27, 31-36.
- 452 Newman E I 1966 A method for estimating the total length of root in a sample. J. Appl.  
453 Ecol. 3, 139-145.
- 454 Neumann E and George E 2005 Extraction of extraradical arbuscular mycorrhizal  
455 mycelium from compartments filled with soil and glass beads. Mycorrhiza 15, 533-  
456 537.
- 457 Patreze C M and Cordeiro L 2004 Nitrogen-fixing and vesicular-arbuscular  
458 mycorrhizal symbiosis in some tropical legume trees of tribe Mimoseae. For. Ecol.  
459 Manag. 196, 275-285.

- 460 Pereira E G, Siqueira J O, Curi N, Moreira F M S and Purcino A A C 1996 Efeitos da  
461 micorriza e do suprimento de fósforo na atividade enzimática e na resposta de  
462 espécies arbóreas ao nitrogênio. Rev. Bras. Fisiol. Veg. 8, 59-65.
- 463 Philips D A and Hayman D S 1970 Improved procedures for clearing roots and staining  
464 parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of  
465 infection. Trans. Brit. Myc. Soc. 55, 158-161.
- 466 Sarruge J R and Haag H P 1974 Análises químicas em plantas. Piracicaba, Escola  
467 Superior de agricultura “Luiz de Queiroz”. 56 pp.
- 468 SAS Institute 1991 Procedure guide for personal computers. Release 6.11. 5. ed. United  
469 States, Cary. 649 pp.
- 470 Schiavo J A and Martins M A 2003 Produção de mudas de acácia colonizadas com  
471 micorrizas e rizóbio em diferentes recipientes. Pesq. Agropec. Bras. 38, 173-178.
- 472 Thrall P H, Millsom D A, Jeavons A C, Waayers M, Harvey G R, Bagnall D J and  
473 Brockwell J 2005 Seed inoculation with effective root-nodule bacteria enhances  
474 revegetation success. J. Appl. Ecol. 42, 740-751.
- 475 Vessey J K 2003 Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil 255,  
476 571-586.
- 477 Vivas A, Marulanda A, Lozano-Ruiz J M, Barea J M and Azcón R 2003 Influence of a  
478 *Bacillus* sp. on physiological activities of two arbuscular mycorrhizal fungi and on  
479 plant responses to PEG-induced drought stress. Mycorrhiza 13, 249-256.
- 480 Walker T S, Bais H P, Grotewold E and Vivanco J M 2003 Root exudation and  
481 rhizosphere biology. Plant Physiol. 132, 44-51.
- 482 Xavier L J C, Germida J J 2002 Response of lentil under controlled conditions to co-  
483 inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia varying in efficacy. Soil  
484 Biol. Biochem. 34, 181-188.

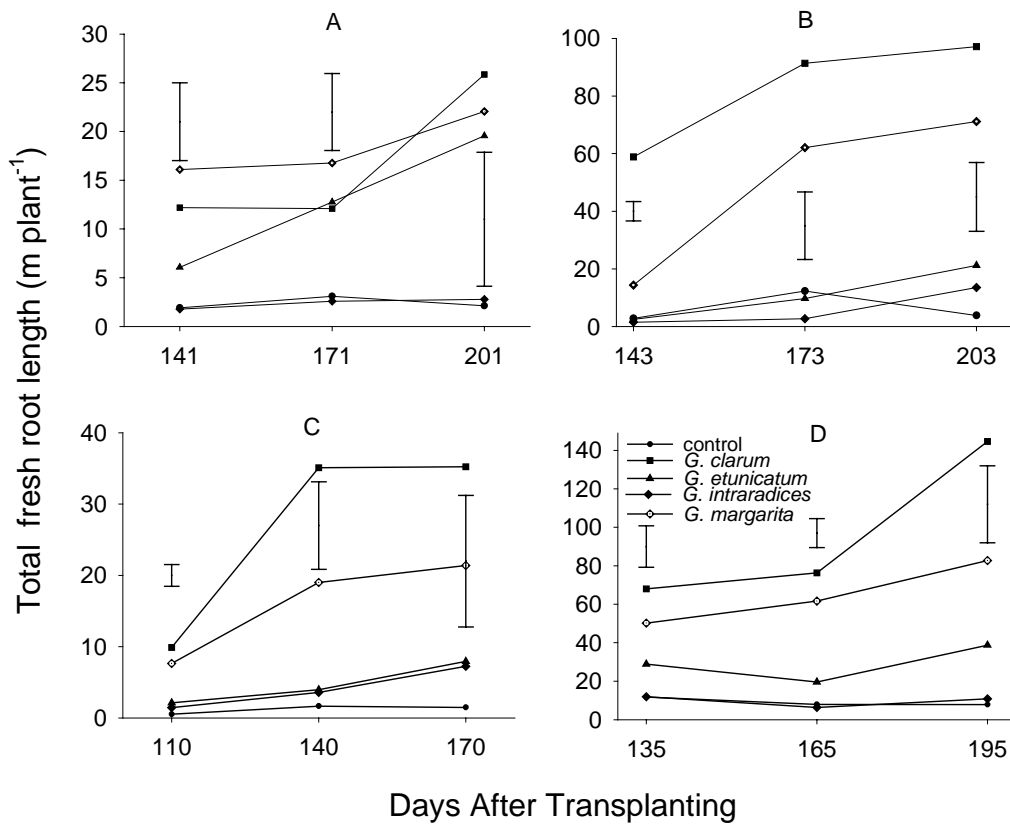
- 485 Xavier L J C and Germida J J 2003 Selective interactions between arbuscular  
486 mycorrhizal fungi and *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* enhance pea yield and  
487 nutrition. Biol. Fert. Soils 37, 261-267.
- 488 Zangaro W, Bononi V L R and Trufen S B 2000 Mycorrhizal dependency, inoculum  
489 potencial and habitat preference of native woody species in South Brazil. J. Trop.  
490 Ecol. 16, 603-622.
- 491 Zangaro W, Nisizaki S M A, Domingos J C B and Nakano E M 2003 Mycorrhizal  
492 response and successional status in 80 woody species from south Brazil. J. Trop.  
493 Ecol. 19, 315-324.



494 **Figure 1:** Growth dynamics of mycorrhizal (*G. clarum*, *G. etunicatum*, *G.*  
 495 *intraradices* or *G. margarita*) or non-mycorrhizal (Control) native woody  
 496 leguminous trees, with (+Rh) or without (-Rh) rhizobacteria co-inoculation. A) *A.*  
 497 *colubrina*; B) *P. dubium*; C) *P. rigida*; D) *E. contortisiliquum*. Arrow indicates the  
 498 time of rhizobacteria inoculation. Vertical bars show the LSD for plant height  
 499 measured just before the last harvest (Duncan,  $p < 0.05$ ).  
 500

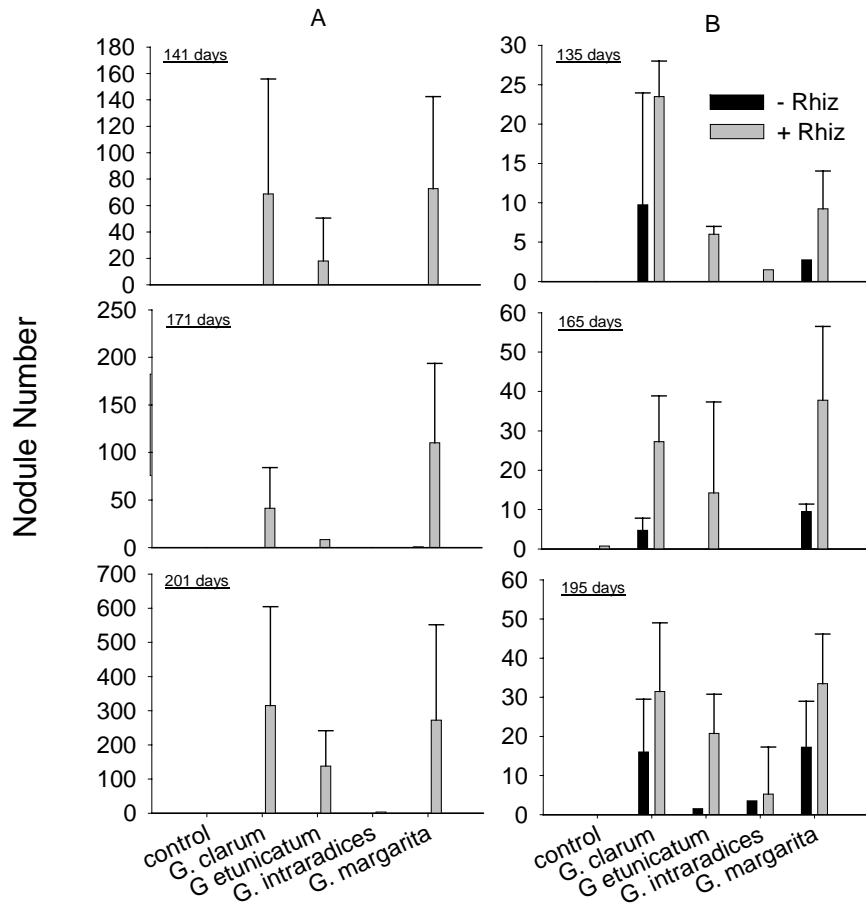


500 **Figure 2:** Shoots and roots dry biomasses of native woody leguminous trees in three  
 501 period of plant growth when inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi (*G. clarum*,  
 502 *G. etunicatum*, *G. intraradices* or *G. margarita*) or not (Control). A) *A. colubrina*; B) *P.*  
 503 *dubium*; C) *P. rigida*; D) *E. contortisiliquum*. Vertical bars show the LSD among 4  
 504 averages (Duncan,  $p < 0.05$ ).



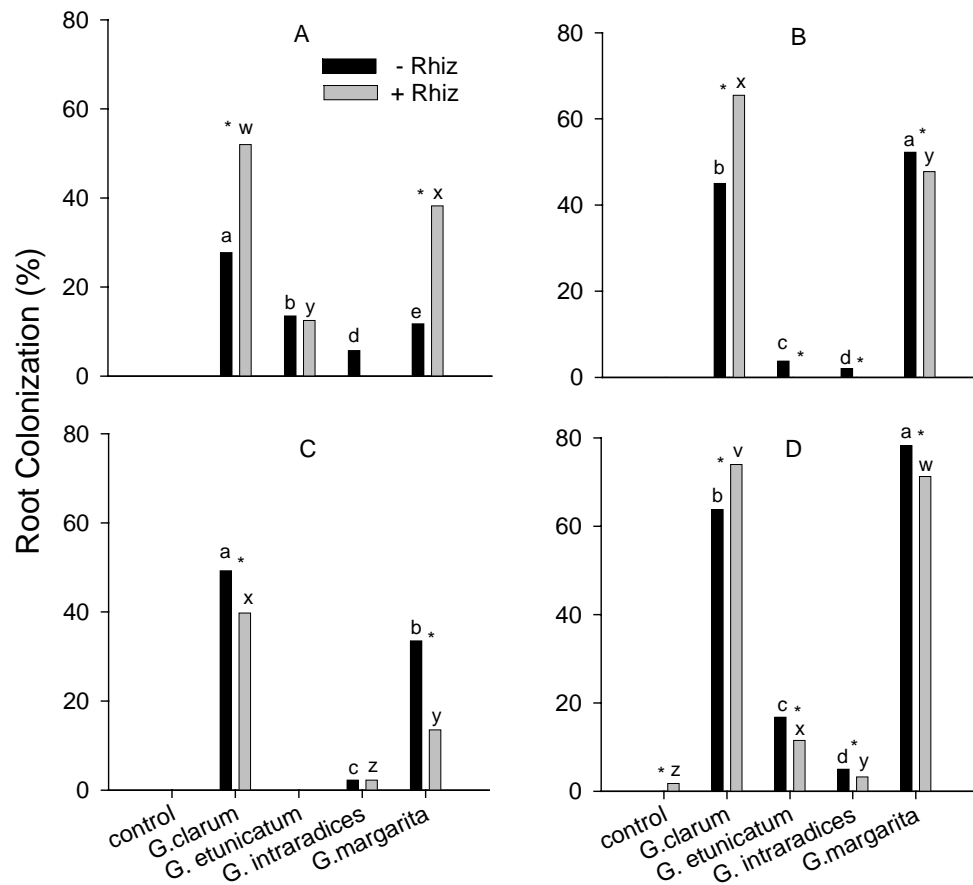
505 **Figure 3:** Total fresh root length of native woody leguminous trees in three period of  
 506 plant growth when inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi (*G. clarum*, *G.*  
 507 *etunicatum*, *G. intraradices* or *G. margarita*) or not (Control). A) *A. colubrina*; B) *P.*  
 508 *dubium*; C) *P. rigida*; D) *E. contortisiliquum*. Vertical bars show the LSD among 4  
 509 averages (Duncan, p<0.05).

510



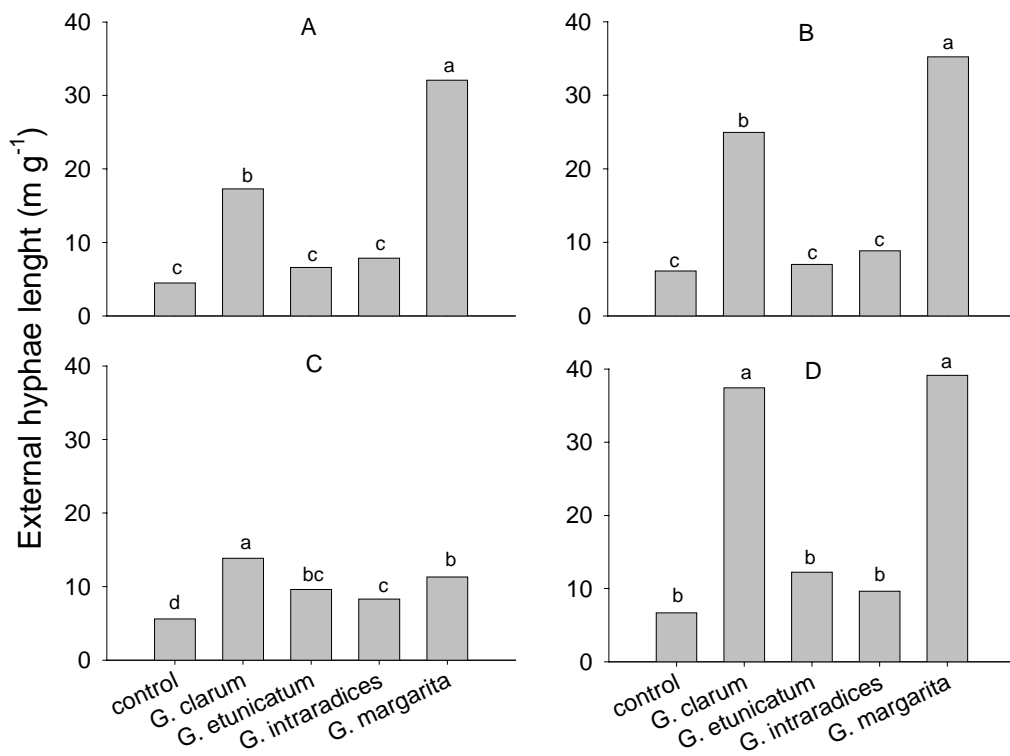
510 **Figure 4:** Effect of inoculation (+Rhiz) or not (-Rhiz) of rhizobacteria on number of  
 511 nodules in two native woody leguminous trees in three period of plant growth, when  
 512 inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi (*G. clarum*, *G. etunicatum*, *G.*  
 513 *intraradices* or *G. margarita*) or not (Control). A) *A. colubrina*; B) *E. contortisiliquum*.  
 514 Vertical bars indicate standard deviation.

515



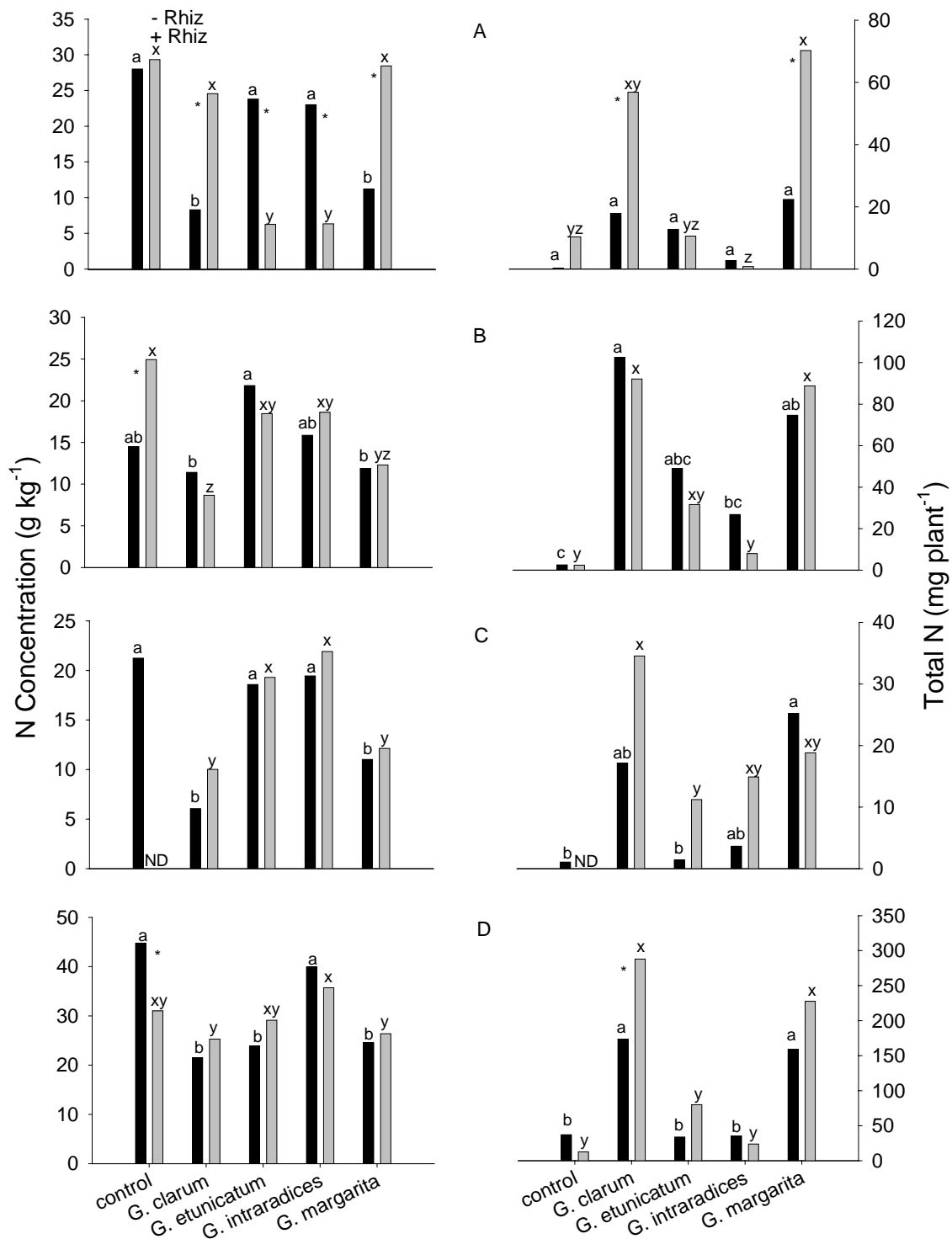
515 **Figure 5:** Percent root colonization of native woody leguminous trees inoculated (*G.*  
 516 *clarum*, *G. etunicatum*, *G. intraradices* or *G. margarita*) or not (Control) with  
 517 arbuscular mycorrhizal fungi, with (+Rhiz) or without (-Rhiz) rhizobacteria. A) *A.*  
 518 *colubrina*; B) *P. dubium*; C) *P. rigida*; D) *E. contortisiliquum*. Means sharing same  
 519 letter, in each leguminous tree, do not differ each other (Duncan,  $p < 0.05$ ). a, b, c, d and  
 520 e: compare arbuscular mycorrhizal fungi without rhizobacteria; v, w, x, y, z, compare  
 521 arbuscular mycorrhizal fungi in the co-inoculation with rhizobacteria. \* Indicate  
 522 significant effect or rhizobacteria in each AMF treatment (Duncan,  $p < 0.05$ ).

523

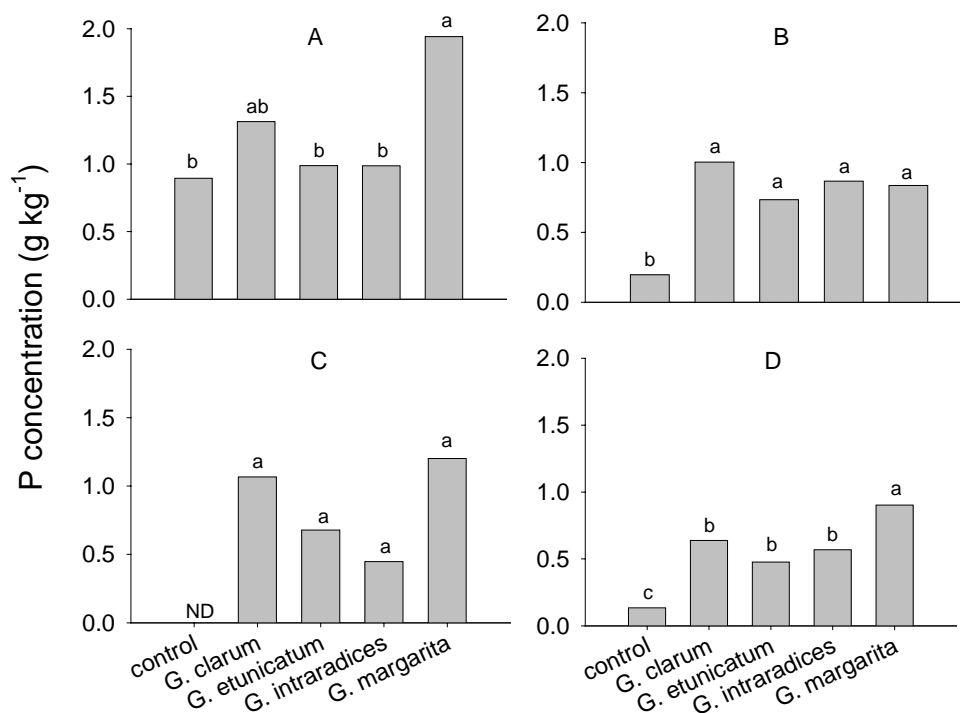


523 **Figure 6:** External hyphae length in soil cultivated with native woody leguminous trees  
 524 inoculated (*G. clarum*, *G. etunicatum*, *G. intraradices* or *G. margarita*) or not (Control)  
 525 with arbuscular mycorrhizal fungi. A) *A. colubrina*; B) *P. dubium*; C) *P. rigida*; D) *E.*  
 526 *contortisiliquum*. Means sharing same letter, in each leguminous tree, do not differ one  
 527 another (Duncan, p < 0.05).

528



528 **Figure 7:** N concentration and Total N in shoots of native woody leguminous trees  
 529 inoculated (*G. clarum*, *G. etunicatum*, *G. intraradices* or *G. margarita*) or not (Control)  
 530 with arbuscular mycorrhizal fungi, with (+Rhiz) or without (-Rhiz) rhizobacteria. A) *A.*  
 531 *colubrina*; B) *P. dubium*; C) *P. rigida*; D) *E. contortisiliquum*. Means sharing same  
 532 letter, in each leguminous tree, do not differ each other (Duncan, p<0.05). a, b, c, d and  
 533 e: compare arbuscular mycorrhizal fungi without rhizobacteria; v, w, x, y, z, compare  
 534 arbuscular mycorrhizal fungi in the co-inoculation with rhizobacteria. \* Indicate  
 535 significant effect or rhizobacteria in each treatment with AMF (Duncan, p<0.05). ND =  
 536 not determined.



537 **Figure 8:** P concentrations in shoots of native woody leguminous trees inoculated (*G.*  
 538 *clarum*, *G. etunicatum*, *G. intraradices* or *G. margarita*) or not (Control) with  
 539 arbuscular mycorrhizal fungi. A) *A. colubrina*; B) *P. dubium*; C) *P. rigida*; D) *E.*  
 540 *contortisiliquum*. Means sharing same letter, in each leguminous tree, do not differ one  
 541 another (Duncan,  $p < 0.05$ ). ND = not determined.