



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALESSANDRA MAREGA MOTTA

**INTERAÇÃO ENTRE BACTÉRIAS FIXADORAS
DE NITROGÊNIO E FUNGO MICORRÍZICO
ARBUSCULAR NO CRESCIMENTO DO
Schizolobium amazonicum (Huber) Ducke EM
CONDIÇÕES DE CAMPO**

LONDRINA
2007

ALESSANDRA MAREGA MOTTA

**INTERAÇÃO ENTRE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO
E FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR NO CRESCIMENTO DO
Schizolobium amazonicum (Huber) Ducke EM CONDIÇÕES DE
CAMPO**

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. Galdino Andrade Filho

Londrina
2007

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Galdino Andrade Filho

Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira

Prof. Dr. Waldemar Zangaro Filho

Londrina, 31 de março de 2007.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Sandra e Caetano, pelo amor, dedicação e formação dada. Vocês são exemplo de bom caráter e superação, eu amo vocês e serei eternamente grata.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãs, por sempre me apoiar em todas as minhas decisões.

Aos meus avós, tios e primos, por sempre me incentivar e prestigiar nos momentos mais importantes da minha vida.

Ao Prof. Dr. Galdino Andrade, meu orientador e amigo, pela confiança, ajuda e credibilidade, que me passou, além dos ensinamentos científicos, sua mentalidade empreendedora e me mostrou que o Biólogo tem lugar no mercado de trabalho.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira, por tudo que me ensinou, pela paciência e ser muito prestativo quando eu mais precisei.

Aos companheiros de laboratório, onde pude fazer verdadeiras amizades, pela companhia no meu dia-a-dia e que tanto me auxiliaram nos meus experimentos. Ainda guardo boas lembranças dos nossos momentos juntos.

À Empresa Servmar, especialmente minhas chefes, que permitiram e incentivaram a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos Ivana, Duca, Renata, Tomás, Leopoldo, Andressa, Rodrigo, Mineiro, Ribeirão, Patrícia, Rafael, Júlia, Vanessa, Augusto, Cássia, Thalita e Tatiana, que de alguma forma me ajudaram, eu não teria conseguido sem vocês.

A todos que participaram deste trabalho.

Muito Obrigada.

SUMÁRIO

1. RESUMO	7
2. ABSTRACT	8
3. INTRODUÇÃO	9
4. OBJETIVOS	11
5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
5.1. Floresta Amazônica e <i>S. amazonicum</i>	15
5.2. Interação solo-raiz-microrganismos	17
5.2.1. Bactérias Fixadoras de Nitrogênio	19
5.2.2. Fungo Micorrizico Arbuscular (MA)	20
5.3. Interação entre MA e Rizobactérias em leguminosas	23
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
 ARTIGO: Interaction among N-fixing bacteria and AM fungi in Amazonian legume tree (<i>S. amazonicum</i>) in field conditions	30

1. RESUMO

Nas últimas décadas a Floresta Amazônica vem sofrendo um processo de degradação acelerado e a exploração das florestas pela indústria madeireira é um dos principais responsáveis. Novas tecnologias devem ser desenvolvidas para tentar amenizar essa situação, como projetos de silvicultura com espécies nativas para suprir a demanda por madeira no mercado. O *Schizolobium amazonicum*, popularmente conhecido como Paricá, é uma leguminosa arbórea nativa e a área cultivada com essa espécie tem aumentado. Esta espécie fornece matéria-prima de qualidade para a obtenção a indústria de compensados. Apesar de *S. Amazonicum* estar sendo plantado em larga escala no norte do Brasil, a cadeia de produção da madeira ainda carece de tecnologia para otimizar a produção dessa espécie. As raízes das plantas interagem diretamente com os microrganismos do solo na rizosfera sendo estas interações importante para a para a manutenção da fertilidade do solo e o desenvolvimento das plantas. O nitrogênio (N) e o fósforo (P) são os nutrientes mais requeridos pelas plantas. As bactérias fixadoras de nitrogênio introduzem este elemento no solo a partir do N₂ atmosférico. Os fungos micorrízicos arbusculares (MA) também desempenham importante papel na nutrição vegetal, pois suas hifas aumentam o volume de solo explorado pelas raízes, permitindo maior absorção de nutrientes como o P e melhor acesso da planta a água. A dupla inoculação destes microrganismos melhora o crescimento das plantas por aumentar a absorção de nutrientes. Neste trabalho avaliamos a eficiência de três fungos MA (*Glomus clarum*, *G. intrarradices* e *G. etunicatum*) associados a três cepas de bactérias fixadoras de N (dois *Rhizobium sp.* e uma *Bulkholderia sp.*) em condições de campo. Foram utilizados dois métodos de plantio: semeadura direta ou através de muda. O *G. intrarradices* foi o mais eficiente no crescimento das plantas quando inoculados nas sementes, enquanto as três linhagens de bactérias não tiveram nenhum efeito neste tipo de plantio, com ou sem a associação de fungos MA. No plantio através de mudas a dupla inoculação foi

mais efetiva. Aos 210 dias as cepas Rhi1 e Rhi2 associadas a *G. clarum* e *G. entunicatum* aumentaram o crescimento das plantas. Aos 390 dias *G. clarum* associado a LEM6 ou Rh1 melhoraram a maioria dos parâmetros avaliados, incluindo biomassa e produção de madeira. O plantio por semeadura direta foi o menos eficiente. Isso mostra que a eficiência dos inóculos de bactérias ou fungos MA depende de qual sistema de plantio será utilizado.

2. ABSTRACT

The Amazon Forest has suffered an accelerated degradation process due to cutting to implant agricultural systems, pasture and electricity generation projects and disorganized mining and wood exploitations. The challenge is to develop new technologies for wood production in agroforestry systems. *Schizolobium amazonicum* is a legume tree, with fast growth and its wood is employed to make furniture. More and more areas have been sowed with *S. amazonicum*, but this production system is very poor technologically. In the present paper we proposed to evaluate the effect on the plant growth and plant survival of three arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus clarum*, *G. intraradices* and *G. etunicatum*) associated with three N-fixing bacteria strains (two *Rhizobium* sp. and one *Burkholderia* sp). Two methods of planting were used: direct sowing or transplantation of seedlings after initial growth in nursery. *G. intraradices* was more effective in plant growth when inoculated in seed, and the bacteria strains had no effect when inoculated alone or with AM fungi. However, in seedlings the dual inoculation was more effective. At 210 days Rhi 1 and Rhi 2 associated with *G. clarum* or *G. etunicatum* increase plant growth. At 390 days *G. clarum* associated with LEM6 or Rhi 1 increased most of the parameters evaluated, including biomass and wood production. Direct sowing is the traditional method largely used in the non-tillage areas and was more ineffective. The presence of microorganisms showed significant differences when compared with non-inoculated

plant. The results suggested that some microbial combinations were effective in stimulating plant growth, but further experiments need to be carried out to evaluate which N-fixing bacteria and AM fungi is more effective for each planting systems for *S. amazonicum*.

3. INTRODUÇÃO

O *Schizolobium amazonicum* (Huber) Ducke, é uma espécie florestal conhecida popularmente como Paricá. Esta árvore destacou-se na produção de madeira, principalmente para indústria de compensados, além de ser utilizada em reflorestamentos. Os trabalhos relacionados com a silvicultura dessa espécie ainda são poucos (Marques, 1990). Na década de 90, vários projetos de silvicultura foram iniciados no sul do Pará visando selecionar espécies arbóreas nativas com potencial para a obtenção de matéria prima para a indústria madeireira, principalmente a de laminação para a produção de compensados.

Apesar de alguns estudos feitos com essa espécie, em relação ao sistema de plantio, as empresas reflorestadoras no Brasil ainda carecem de tecnologia e estudos para aumentar a produção do *S. amazonicum*. O Paricá é plantado de forma bastante rudimentar e em solo campinado, sendo pouco observado o plantio através de muda. Além disso, não há relatos de estudo de avaliação de inoculantes sobre o crescimento de mudas em condições de casa de vegetação ou de campo.

A fixação biológica de nitrogênio é crucial para a manutenção da vida na Terra. O nitrogênio é encontrado na natureza na forma molecular (N_2), íons nitrato (NO_3), amônia (NH_3) ou incorporado em compostos orgânicos, fazendo parte da estrutura de ácidos nucléicos (DNA e RNA) e aminoácidos formadores das proteínas, peças chave na estrutura de qualquer ser vivo. O principal mecanismo biológico que reduz o nitrogênio molecular a amônia, é a atividade dos seres vivos fixadores de nitrogênio (Drozdowicz, 1997).

Muitas espécies de plantas arbóreas, principalmente as espécies pioneiras e secundárias, associam-se a bactérias e fungos MA, uma vez que em estágios iniciais de uma sucessão ecológica o solo geralmente é oligotrófico. A associação das plantas arbóreas com fixadores de nitrogênio e fungos MA que aumentam a capacidade de absorção de minerais impulsiona o desenvolvimento das plantas, criando condições no solo para o estabelecimento dos grupos ecológicos seguintes. Em espécies arbóreas, divididas em quatro grupos sucessionais (pioneiras, secundárias iniciais, secundárias tardias e clímax), da bacia hidrográfica do rio Tibagi (PR), Zangaro Filho (1997) demonstrou que as pioneiras são extremamente dependentes da associação com fungos MA, praticamente não crescendo na ausência destes fungos. A dependência praticamente desaparece nos demais grupos sucessionais, sugerindo que em programas de revegetação as espécies pioneiras devam ser inoculadas com fungos micorrízicos como alternativa para se acelerar o processo de recuperação da cobertura vegetal.

Quanto ao Paricá, não existe nenhum dado relacionado a influência de fungo micorrízico arbuscular associado ou não com bactérias diazotróficas sobre seu crescimento. Este estudo é resultado de experimento feito em campo com bactérias diazotróficas isoladas de raiz de planta carnívora *Dorsera villosa* var. *villosa* e fungo micorrízico arbuscular inoculados na raiz de Paricá. Portanto o objetivo deste trabalho é verificar a eficiência dessas bactérias e fungo micorrízico arbuscular no crescimento do *S. amazonicum* plantado em condições de campo, no Estado do Pará.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi investigar a interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio (N) e fungos micorrízicos arbusculares e o seu efeito no crescimento e produção de madeira do *S. amazonicum*, em condições de campo no sul do Estado do Pará.

4.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a efetividade das cepas fixadoras de N no crescimento do *S. amazonicum*
- Avaliar a influência dos fungos MA na efetividade das cepas fixadoras de N.
- Selecionar as cepas de bactérias fixadoras de N mais efetivas quanto à fixação de N e estímulo de crescimento do Paricá.

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1 Floresta Amazônica e *S. amazonicum*

A floresta amazônica vem sofrendo um processo de degradação acelerado por vários motivos como a exploração madeireira, o desmatamento para estabelecer novas áreas agrícolas e projetos para a geração de energia. A ação do homem na exploração massiva do solo e da floresta afeta o ecossistema, e a prática da agricultura na Amazônia é limitada devido à baixa fertilidade do solo (Garvia, 2003). A remoção da 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).

Esse processo de desmatamento da floresta amazônica, que se iniciou nos anos sessenta, tem sido mais intenso nos últimos anos com a destruição de grandes áreas de floresta primária. Observa-se a criação de uma paisagem caracterizada por fragmentos de floresta em diferentes estágios de sucessão, sofrendo forte pressão do homem e dificuldade em preservar a biodiversidade (Gascon et. al.,2001; Vieira et. al., 1998).

A regeneração de árvores nativas é fundamental para o manejo da produção de madeira nas florestas tropicais. No desmatamento de uma área ocorre perda de fertilidade do solo superficial, o que é responsável pela diminuição do potencial de estabilização e crescimento das árvores nativas, conseqüentemente prejudicando a regeneração das florestas tropicais (Pinard et. al., 2000).

Dentro deste panorama, é necessário que novas tecnologias sejam desenvolvidas e implementadas na região. A demanda por madeira no mercado interno e externo é crescente, por isso projetos de silvicultura com espécies nativas devem ser estabelecidos na região com o objetivo de gerar madeira para indústria de manufaturamento, construção civil, assim como para a obtenção de energia.

A indústria madeireira é importante por contribuir para a geração de renda para população, porém a forma desordenada de utilização dos recursos naturais gera grande preocupação e até a inviabilidade econômica da extração de madeira de matas nativas. Por isso as indústrias madeireiras estão investindo no plantio de espécies de rápido crescimento e elevado valor comercial, tentando assim manter a sua produção com madeiras de florestas plantadas. A implantação da silvicultura é muito importante na região para suprir as necessidades de matéria-prima das indústrias madeireiras e assim reduzir o desmatamento das florestas nativas. Isso deve contribuir para a conservação da floresta amazônica e a sustentabilidade da atividade madeireira (Costa, 1998).

Muitos projetos de silvicultura foram iniciados no sul do Pará visando selecionar espécies arbóreas nativas com potencial para a obtenção de matéria prima para a indústria madeireira, principalmente a de laminação para a produção de compensados. Rondon (2000) avaliou 30 espécies florestais com 54 meses de idade e constatou que o *S. amazonicum* se destacou em crescimento e forma de plantio.

O *S. amazonicum* (Huber) Ducke, conhecida popularmente como Paricá, é uma espécie de leguminosa arbórea da família Caesalpinaceae, nativa da floresta Amazônica. Esta espécie é uma árvore de grande porte e rápido crescimento, que ocorre em mata primária e secundária de terra firme e várzea alta (Ducke, 1949). O *S. amazonicum* é uma espécie florestal que vem sendo largamente utilizada em reflorestamento por apresentar algumas vantagens, tais como: rápido crescimento e relativamente resistente a pragas e doenças (Cordeiro et al., 2004).

O Paricá é uma árvore importante que fornece matéria-prima para indústria madeireira. Sua madeira é considerada leve ($0,30 \text{ g/cm}^3$), de cor branca e superfície lisa e sedosa, características que a qualificam para fabricação de palitos, compensados, forros e canoas (Le Cointe, 1947). Segundo Melo (1973), esta espécie também pode fornecer boa matéria-prima para a obtenção de celulose para papel, pois apresenta fácil branqueamento e excelente resistência. Seu tronco é alto e liso, com

casca cinzenta e de tonalidade clara, madeira de coloração branco-amarelado-claro com superfície lisa mais ou menos sedosa. Essa árvore pode alcançar de 20 a 30 m de altura e até um metro de diâmetro (Lima et al., 2003). O Paricá apresenta rápido desenvolvimento em altura e diâmetro, por isso está incluído na seleção de espécies leguminosas para sistemas agroflorestais na amazônia (Marques, 2004).

Quanto ao sistema de plantio, as empresas reflorestadoras no Brasil ainda carecem de tecnologia e estudos para otimizar o aumento da produção dessa espécie. Os trabalhos relacionados com a silvicultura dessa árvore ainda são poucos (Marques, 1990).

Hoje em dia o Paricá é plantado de forma bastante rudimentar, sendo o método mais utilizado o de semeadura direta, onde duas sementes escarificadas são introduzidas no solo capinado e ocorrendo o desbaste de uma planta semanas após a semeadura. O plantio de mudas também é observado na região, mas em escala menor. Ainda neste sistema, não existe seleção de matrizes para produção de sementes e mudas, assim como as mudas são plantadas em solo bruto, com a flora microbiana nativa.

Entre os poucos estudos que foram realizados, Rondon (2000) avaliou a influência de diferentes espaçamentos entre as árvores no crescimento das plantas. Outros autores avaliaram diferentes doses de boro e sua influência no crescimento da planta (Lima et al., 2003). Entretanto, não há relatos de estudo de avaliação de inoculantes microbianos sobre o crescimento de mudas desta espécie em condições de casa de vegetação ou de campo.

5.2 Interação solo-raiz-microrganismos

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 na rizosfera (Lovato, 2006), a região do solo que recebe influência direta das raízes e dos microrganismos.

A composição do solo e da microbiota na rizosfera tem influência direta na aquisição de nutrientes pelas plantas. Alguns grupos de microrganismos atuam diretamente na nutrição das plantas, como rhizóbio e micorrizas. Influências externas como a degradação das florestas e o manejo do solo atingem diretamente o equilíbrio dessa relação planta-microrganismos.

Na interação planta-microrganismo, as plantas como organismos autotróficos apresentam a importante função de liberar moléculas orgânicas no solo. Este processo pode ocorrer por dois caminhos: através da deposição de materiais orgânicos e através da exsudação de nutrientes na rizosfera. Estes compostos liberados pela raiz constituem as fontes principais de nutrientes para microbiota do solo (Andrade, 2004).

A comunidade microbiana do solo é composta por várias espécies que agem nos ciclos biogeoquímicos e são importantes para a fertilidade do solo e crescimento das plantas (Andrade, 2004). A ação dos microrganismos nos diferentes tipos de solo pode interferir no ciclo biogeoquímico e mudar a diversidade biológica e a eficiência de um ecossistema (Matsumoto, 2004).

O crescimento das plantas é fortemente influenciado pela dinâmica da comunidade microbiana e pela sua função no ecossistema, como a reciclagem de nutrientes e decomposição da matéria orgânica (Donnison et al., 2000). Esses processos são diretamente relacionados com as comunidades microbianas, pois vários estágios do ciclo da reciclagem de nutrientes são mediados exclusivamente por

microrganismos e alguns deles participam em um ou mais ciclos biogeoquímicos (Anderson, 2003).

No microcosmo do solo, os microrganismos crescem formando populações metabolicamente ligadas que podem ser chamadas de grupos funcionais. Pode-se definir os grupos funcionais como: “populações que fazem parte da transformação do mesmo nutriente no solo, onde a mesma população pode participar de diferentes passos em diferentes ciclos bioquímicos” (Andrade, 2004).

Os grupos funcionais microbianos participam dos ciclos biogeoquímicos tais como os ciclos do nitrogênio, fósforo, carbono, enxofre, etc. No solo, esses ciclos são importantes para reciclagem de nutrientes (Matsumoto, 2004). A relação entre os ciclos do C, N, P e S e os grupos funcionais de microrganismos mais a influência destes no crescimento das plantas, é um importante indicador na avaliação de distúrbios no solo (Anderson, 2003).

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 (Lovato, 2006). 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).

Vessey (2003) definiu os biofertilizantes como substâncias contendo microrganismos vivos que colonizam a rizosfera ou o interior da planta, quando aplicados no solo ou na semente. Os biofertilizantes podem promover o crescimento da planta por aumentar o suprimento e a disponibilidade de nutrientes, portanto sua aplicação apresenta grande avanço na produção de mudas de espécies nativas.

A aplicação de microrganismos para substituir a utilização de fertilizantes deve ser mais compreendida por ser ambientalmente sustentável e de menor custo. A

produção de mudas de boa qualidade é um fator importante para os projetos de reflorestamento, devido ao fato destes projetos serem muito prejudicados pela baixa sobrevivência das plantas após o trans-plantio. A inclusão de alguns microrganismos simbiotes pode contribuir para o aumento da qualidade das mudas, por promover maior tolerância a estresses e favorecer a absorção de nutrientes, aumentando a sobrevivência dessas mudas no campo (Schiavo & Martins, 2003).

5.2.1. Bactérias Fixadoras de Nitrogênio

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). A fixação biológica de nitrogênio é um dos principais processos envolvidos na manutenção da vida nos ecossistemas, sendo também um exemplo de interação sinérgica entre microrganismos e vegetais (Albino, 2004). Assim como muitos habitats dependem das plantas para suprir o carbono orgânico usado como fonte de energia, todos os organismos dependem da fixação do nitrogênio atmosférico (Atlas e Bartha, 1998), fundamental para a manutenção da biosfera.

Na forma em que se encontra na atmosfera (N_2), o nitrogênio é acessível somente a um pequeno grupo de procariotos. Estes microrganismos possuem a enzima nitrogenase, que é capaz de reduzir o N_2 para a forma inorgânica combinada NH_3 , que pode se tornar disponível para plantas e outros organismos. Esta pequena parcela de organismos procariotos é chamada de fixadores de nitrogênio ou diazotróficos (Moreira & Siqueira, 2002). A mineralização dos compostos nitrogenados no solo (amonização e nitrificação) é um processo essencialmente microbiológico. As duas fases são igualmente importantes pois as plantas são capazes de absorver nitrogênio nas duas formas NH_4^+ e NO_3^- (Andrade, 2004).

A nitrogenase é uma enzima complexa responsável pela fixação do nitrogênio, que requer grandes quantidades de energia para sua atividade. O complexo enzimático nitrogenase rompe a tripla ligação existente entre os dois átomos do nitrogênio atmosférico e o transforma na forma utilizável pela planta, a amônia (NH_3^+) e o nitrato (NO_3^-) (Albino, 2004).

Para que a amônia seja transportada para os locais de demanda, é transformada, no citosol das células da planta, 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-Ureídos (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).

Em um ecossistema existem as bactérias diazotróficas de vida livre e as que formam nódulos nas raízes das leguminosas. O gênero de bactérias de vida-livre associa-se com as plantas na rizosfera, enquanto as noduladoras formam nódulos nas raízes das plantas.

Vários gêneros de bactérias foram descritos como fixadores de nitrogênio: *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 ou através de vetores como os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (Franke et al., 2000; Cocking, 2003). Algumas bactérias do gênero

Rhizobium e *Pseudomonas* se aderem a hifas de fungos MA, 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 de espécies de fungos MA da família *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 a simbiose entre leguminosa-rizóbio tem grande importância econômica. Em ambientes com deficiência de nitrogênio (N), a fixação biológica simbiótica entre leguminosas e rizóbio auxilia o estabelecimento e melhora a sobrevivência das plantas. 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.

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 N₂, 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 e aumento de resistência a estresses (Dobbelaere et al., 2003).

5.2.2. Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas

As bactérias rizosféricas simbiotes que estimulam o crescimento das plantas podem ser chamadas de rizobactérias promotoras de crescimento, das iniciais em inglês PGPR (Dobbelaere et al., 2003). As PGPR estão geralmente em contato com a

superfície das raízes e podem otimizar o crescimento da planta através de mecanismos como melhora da nutrição mineral, supressão de doenças ou síntese de fitormônios (Weller, 1988).

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 (Lovato, 2006). Espécies pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum* e *Pseudomonas* estão incluídas nesse grupo de rizobactérias (Dobbelaere et al., 2003).

Os fitormônios, como as auxinas e giberelinas, são substâncias orgânicas que influenciam nos processos fisiológicos da planta, portanto a baixa concentração dos fitormônios provoca mudanças nas características e no crescimento das plantas.

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 ainda a produzir sideróforos que facilitam a absorção de ferro pela a planta (Bevivino et al, 1998).

5.2.3. Fungo Micorrizico Arbuscular (MA)

As micorrizas são as relações mutualistas mais comuns na natureza, sendo formadas por certos fungos do solo e as raízes da maioria das plantas (Smith & Read, 1997). Os benefícios da associação micorrízica são manifestados após o estabelecimento do fungo nas raízes e no solo ao seu redor (Koide & Schreiner 1992). As hifas aumentam a superfície de absorção de nutrientes que são transportados para as raízes (Gianinazzi-Pearson 1996). As pesquisas têm demonstrado a importância destas associações no estabelecimento e desenvolvimento de plantas em solos de baixa fertilidade (Oliveira et al. 1999), em áreas degradadas e em sistemas

agroflorestais (Haselwandter & Bowen 1996), promovendo o crescimento e a sobrevivência de plantas e a reabilitação dos solos (Graham 1994).

A inoculação de fungos MA garante efeitos benéficos, podendo ser efetuada no solo durante a semeadura de plantas anuais e de pastagens, na formação de mudas de espécies arbustivas ou arbóreas, com finalidades agronômica, florestal, de recuperação ambiental e de ornamentação. As respostas da inoculação variam de 10% a 80% em aumento da biomassa vegetal (Siqueira & Franco 1998).

O efeito benéfico da inoculação com fungo MA nas plantas hospedeiras conduz ao aumento na absorção de P, aumentando seu conteúdo na raiz e na parte aérea, o que reflete no aumento da biomassa vegetal (Habte & Manjunath 1987; Dighton, 1991). Siqueira et al. (1998) observaram que a inoculação aumentou o conteúdo de P, K, Ca, Mg e S na parte aérea das espécies arbóreas dos estádios iniciais a sucessão das florestas do sudeste do Brasil. E, de acordo com Zangaro et al. (2000), a inoculação com MA elevou o conteúdo de P, K e Ca na folha, aumentando a massa seca das raízes e da parte aérea, especialmente nas espécies de plantas arbóreas nativas que participam do estágio inicial da sucessão vegetal.

Em solos com alta capacidade de adsorção de P, a concentração deste na solução do solo será baixa e a difusão para as raízes será reduzida. É nesse tipo de solo que os grandes benefícios serão obtidos pelas plantas associadas com MA. As espécies de plantas podem diferir no requerimento externo para o P devido às diferenças em suas taxas de crescimento máximo, na capacidade para absorção de P e na utilização deste no interior da planta (Zangaro et. al., 2005).

O fungo leva nutrientes para a planta, principalmente o P, enquanto esta supre o fungo com carboidratos fotoassimilados. Segundo Barea et al. (1989), 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 relação

simbiótica envolve efluxo passivo de solutos do doador seguido de uma tomada ativa pelo organismo receptor (Ferrol et al., 2002).

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). 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).

Muitas espécies de plantas arbóreas, principalmente as espécies pioneiras e secundárias, associam-se a bactérias e fungos MA. A associação das plantas arbóreas com fixadores de N e fungos MA que aumentam a capacidade de absorção de nutrientes impulsiona o desenvolvimento das plantas, criando condições no solo para o estabelecimento dos grupos ecológicos seguintes (Zangaro et. al., 2003).

Em espécies arbóreas, agrupadas em quatro grupos sucessionais (pioneiras, secundárias iniciais, secundárias tardias e clímax), da bacia do rio Tibagi (PR), Zangaro Filho (1997) demonstrou que as pioneiras são extremamente dependentes da associação com fungos MA, praticamente não crescendo na ausência destes fungos. A dependência diminui nos demais grupos sucessionais, sugerindo que em programas de revegetação as espécies pioneiras devam ser inoculadas com fungos micorrízicos como alternativa para se acelerar o processo de recuperação da cobertura vegetal.

Os fungos MA desempenham um importante papel no desenvolvimento das plantas, pois aumentam o volume de solo explorado pelas raízes, permitindo maior absorção de nutrientes como o P, aumenta o acesso da planta a água, reduzem danos causados por patógenos e protegem contra outros estresses abióticos.

5.3. Interação entre Fungo Micorrizico Arbuscular (MA) e Rizobactérias em leguminosas arbóreas

As leguminosas associadas ao fungo MA e rizóbio têm sido utilizadas em programas de recuperação de áreas degradadas, em sistema agroflorestais e agropastoris, as plantas que se associam às bactérias diazotróficas e fungos MA possuem mais sucesso na revegetação, pois as plantas podem apresentar maior sobrevivência no campo.

A associação das plantas com esses dois simbiontes é chamada de simbiose tripartite (Xavier & Germida, 2002). A simbiose tripartite é eficiente pois o rizóbio consome muito P na relação com as plantas, então o fungo MA ajuda a suprir essa demanda por P. 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).

As bactérias diazotróficas disponibilizam N às plantas enquanto os fungos micorrizicos 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).

As 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 micorrizicos. 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.

A resposta da leguminosa hospedeira ao *Rhizobium* pode ser modificada pelas espécies MA envolvidas na associação tripartite e os benefícios da planta nessa simbiose são superiores aos das plantas controle não inoculadas, ou àquelas inoculadas isoladamente com MA ou *Rhizobium* (Xavier & Germida, 2002). As bactérias diazotróficas podem se beneficiar da associação da planta com MA para facilitar sua colonização, pois os fungos MA funcionam como vetores para as bactérias penetrarem nas raízes das plantas.

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 MA e bactérias (Marques et al., 2001; Xavier & Germida, 2003). 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.

A associação conjunta das bactérias diazotróficas com MA pode aumentar o nitrogênio fornecido às plantas pelas bactérias. Uma explicação para o aumento na fixação de N₂ em plantas micorrizadas é que quando, N e P são limitantes, os MA podem aumentar a absorção de P pela planta, conferindo à planta melhores condições de fornecer mais energia para a fixação de N₂ por *Rhizobium* na forma de ATP (Artursson et al., 2005).

O crescimento de leguminosas é dependente de uma combinação específica de MA e rizóbio, indicando que há melhores resultados em interações sinérgicas entre microssimbiontes compatíveis (Xavier & Germida, 2003).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, L. K.; ROBSON, A. D. Infectivity and effectiveness of five endomycorrhizal fungi: competition with indigenous fungi in field soils. *Australian Journal of Agricultural Research*, Victoria, v. 32, p. 621-630, 1981.
- 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.
- ANDERSON, T.H. Microbial eco-physiological indicators assess soil quality. *Agric. Eco. Environ.* 98, 285–293. 2003
- ANDRADE G.. Role of functional groups of microorganisms on the rhizosphere microcosm dynamics. In: (Eds.) Ajit Varma; Lynette Abbott; Dietrich Werner; Rudiger Hampp. *Plant surface microbiology*. p. 51-69. Springer-Verlag, Berlin. 2004
- ANDRADE G.. The Functional Groups of Micro-organism Used as Bio-indicator on Soil Disturbance Caused by Biotech Products such as *Bacillus thuringiensis* and Bt transgenic plants. In: (Eds.) Ajit Varma; Lynette Abbott; Dietrich Werner; Rudiger Hampp. *Plant surface microbiology*. p. 121-132. Springer-Verlag, Berlin. 2004
- ARTURSSON V., FINLAY, R.D.JANSSON, J.K.. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental microbiology* doi:10.1111/j.1462-2920.2005.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. *Microbial ecology: fundamentals and applications*. 4 ed. Redwood: Cummings Science, 694p. 1998
- BAREA, J.M.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Timecourse of N₂ (15N) fixation in the field by clover growing alone or in mixture with ryegrass to improve pasture productivity, and inoculated with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytology*, v.112, n.3, p.399-404, 1989.
- 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.
- BIANCIOOTTO, 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.
- BIANCIOOTTO, 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.

- BIANCIOOTTO, 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.
- 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.
- COCKING, E. C. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant and Soil* 252:169-175, 2003.
- CORDEIRO I.M., LAMEIRA O.A., OHASHI S.T., ROSAL L.F. Efeito de bap sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (Paricá). *Cerne*, Lavras 10: 118-124, 2004.
- COSTA, R. G. C. P. Percepções sobre as mudanças ambientais a partir das atividades de produção dos pequenos produtores em duas comunidades na Amazônia Oriental. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANA DE SOCIOLOGIA RURAL, 6., 2002
- DIGHTON J. Acquisition of nutrients from organic resources by mycorrhizal autotrophic plants. *Experientia* 47:362–369. 1991.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22:107-149, 2003.
- DONNINSON L.M., GRIFFITH G.S., HEDGER J., HOBBS P.J., BARGETT R.D. Management influences on soil microbial communities and their function in botanically diverse haymeadows of northern England and Wales. *Soil Biol. Biochem.* 32: 253-263, 2000
- DUCKE, A. Notas sobre a flora neotropical II: As leguminosas da Amazônia brasileira. 2.ed. Belém, IAN 1949. 248 p. (IAN Boletim Técnico, 18).
- FERROL N., POZO M. J., ANTELO M., AGUILAR A. A. Arbuscular mycorrhizal symbiosis regulates plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in tomato plants. *Journal Experimental Botany* Vol. 53, No. 374, pp. 1683-1687, July 1, 2002
- FRANCO, A. A.; FARIA, S. M. The contribution of N₂-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.
- GARVIA C. A.R., KLEINN C., OLSCHESKI R. Land Cover Analysis and Afforestation Options for Mitigation of Climate Change in the Lowlands of Bolivia. Institute of Forest Management, Büsgenweg 5 App 118, 37077 Göttingen, Germany. 2003

- GASCON, C., BIERREGARD Jr., R.O., LAURENCE, W., RANKIN-DE M., J. Deforestation and forest fragmentation in the Amazon. In: Bierregard Jr., R.O., Gascon, C., Lovejoy, T.E., Mesquita, R.C.G. (Eds.), *Lessons from Amazonia: The Ecology and Conservation of a Fragmented Forest*. Yale University Press, New Haven, London, pp. 21–30. 2001
- GIANINAZZI-PEARSON, V. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *Plant Cell.*, 8:1871-1883, 1996.
- GRAHAM, J.H. & EISSENST, D.M. Host genotype and the formation and function of VA mycorrhizae. *Plant Soil*, 159:179-185, 1994
- HABTE, M.; MANJUNATH, A. Soil solution phosphorus status and mycorrhizal dependency in *Leucaena leucocephala*. *Applied Environmental and Microbiology*, Washington, v. 53, n. 4, p. 797-801, Apr. 1987.
- HASELWANDTER, K.; BOWEN, G.D. Mycorrhizal relations in trees for agroforestry and land rehabilitation. *Forest Ecology and Management*, v.81, p.1-17, 1996.
- HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília: EMBRAPA, 542 pp, 1994.
- KOIDE, R.T.; SCHREINER, R.P. Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.43, p.557-581, 1992.
- JANOS, D. P. Mycorrhizas, succession, and the rehabilitation of deforested lands in the humid tropics. In: FRANKLAND, J. C.; MAGAN, N.; GADD, G. M. (Ed.). *Fungi and environmental change*. Cambridge: Cambridge University Press. p. 129-162. (British Mycological Society Symposium, 20). 1996
- LE COINT, P. Árvores e plantas úteis (indígenas e aclimadas). 2. ed. São Paulo: Nacional 496 p. (Brasiliana, 251), 1947.
- LIMA, S.F., CUNHA, R.L., CARVALHO, J.G., SOUZA, C.A.S., CORREAS, F.L.O. Comportamento do Paricá (*Schizolobium amazonicum* Herb.) submetido à aplicação de doses de boro. *Cerne*, 9:192-204, 2003.
- LOVATO G. M., NOGUEIRA M. A. Interactions between arbuscular mycorrhiza and rhizobacteria on native woody leguminous trees useful in reforestation, 2006.
- MARQUES, C. L. T. Comportamento inicial de paricá, tatajuba e eucalipto, em plantio consorciado com milho e capim-marandu, em Paragominas, PARÁ. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, 1990.
- MARQUES M., SÁ A.L., CARVALHO J.G., LACERDA M.P.C., MOTA P.E.F. Exigências nutricionais do Paricá (*Schizolobium amazonicum*, Herb.). *Cerne*, Lavras, 10: 167-183, 2004.

- MATSUMOTO L.S., MARTINES A.M., AVANZIA M.A., ALBINO U.B., BRASIL C.B., SARIDAKI D.P., RAMPAZO L.G.L, ZANGARO W., ANDRADE G. Interactions among functional groups in the cycling of carbon, nitrogen and phosphorus in the rhizosphere of three successional species of tropical woody trees. *Applied Soil Ecology* 28:57-65, 2005.
- MELO, C. F. M. de. Relatório ao Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal sobre a Viabilidade do aproveitamento madeireiro do Paricá (*Schizolobium amazonicum*). Belém:EMBRAPA-CPATU, 6 p. 1973
- 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.
- OLIVEIRA, L. A. Micorrizas arbusculares e teores nutricionais em bananeiras (*Musa spp*) em um latossolo da Amazônia; XX Congresso Brasileiro de Microbiologia; 1999; 1; 1; ; 288; 288; XX Congresso Brasileiro de Microbiologia; Salvador; BRASIL;
- PINARD, M.A., BARKER, M.G., TAY, J., Soil disturbance and post-logging forest recovery on bulldozer paths in Sabah, Malaysia. *For. Ecol. Manage.* 130, 213–225, 2000.
- RONDON, E. V. Comportamento de Essências Florestais Nativas e Exóticas no Norte de Mato Grosso. In; FLOREST 2000 - CONGRESSO E EXPOSIÇÃO INTERNACIONAL SOBRE FLORESTAS, 6., 2000. Porto Seguro, BA. Resumos Técnicos... Porto Seguro: BIOSFERA, 2000. p. 68.
- 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
- SYLVIA, D. M.; WILLIAMS, S. E. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stress. In: BETHLENFALVAY, G. J.; LINDERMAN, R. G. (Ed.). *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. Madison: ASA Special Publication, p. 101-124. 1992
- SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; GRISI, B.M.; HUNGRIA, M; ARAUJO, R.S. Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. EMBRAPA, Brasília: EMBRAPA, 142 p. 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.
- SMITH, E.S., Read, J.D.. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, San Diego, 605 pp. 1997

- 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 (32P) 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.
- VIEIRA, G., BRANDÃO, M.J., BLAIR, C. Ecofisiologia do estabelecimento de plântulas de espécies florestais da Amazônia. In: Higuchi, N., Campos, M.A.A., Sampaio, P.T.B., Santos, J. (Eds.), Pesquisas florestais para a conservação da floresta e reabilitação de áreas degradadas da Amazônia. INPA, Manaus, pp. 153–170. 1998
- 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. e 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
- 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.

Interaction among N-fixing bacteria and AM fungi in Amazonian legume tree (*Schizolobium amazonicum*) in field conditions

Marco Antonio Siviero^b, Alessandra Marega Motta^a, Dáfila dos Santos Lima^a, Renato Rosselli Birolli^b, Samuel Yun Huh^b, Ivana Abonizio Santinoni^a, Letícia Sayuri Murate^a, Cícera Maria Antonia de Castro^a, Marina Yumi Horta Miyauchi^a, Waldemar Zangaro^c, Marco Antonio Nogueira^a, Galdino Andrade^{a*}

^aLaboratório de Ecologia Microbiana, Departamento de Microbiologia, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, 86051-990 Londrina, PR, Brazil

^bGrupo Arboris, Rua Gonçalves Dias, 919, Centro, 68633-000 Dom Eliseu, PA, Brazil

^cDepartamento de Biologia Animal e Vegetal, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, 86051-990 Londrina, PR, Brazil

Abstract

The Amazon Forest has suffered an accelerated degradation process due to cutting to implant agricultural systems, pasture and electricity generation projects and disorganized mining and wood exploitations. The challenge is to develop new technologies for wood production in agroforestry systems. *Schizolobium amazonicum* is a legume tree, with fast growth and its wood is employed to make furniture. More and more areas have been sowed with *S. amazonicum*, but this production system is very poor technologically. In the present paper we proposed to evaluate the effect on the plant growth and plant survival of three arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus clarum*, *G. intraradices* and *G. etunicatum*) associated with three N-fixing bacteria strains (two *Rhizobium* sp. and one *Burkholderia* sp). Two methods of planting were used: direct sowing or transplantation of seedlings after initial growth in nursery. *G. intrarradices* was more effective in plant growth when inoculated in seed, and the

bacteria strains had no effect when inoculated alone or with AM fungi. However, in seedlings the dual inoculation was more effective. At 210 days Rhi 1 and Rhi 2 associated with *G. clarum* or *G. etunicatum* increase plant growth. At 390 days *G. clarum* associated with LEM6 or Rhi 1 increased most of the parameters evaluated, including biomass and wood production. Direct sowing is the traditional method largely used in the non-tillage areas and was more ineffective. The presence of microorganisms showed significant differences when compared with non-inoculated plant. The results suggested that some microbial combinations were effective in stimulating plant growth, but further experiments need to be carried out to evaluate which N-fixing bacteria and AM fungi is more effective for each planting systems for *S. amazonicum*.

Key words: Schizolobium amazonicum, agroforestry, Amazon, mycorrhiza, nitrogen fixation

Introduction

The Amazonian forest has suffered an accelerate degradation process due to cutting to implant agricultural systems, pasture and electricity generation projects, disorganized mining, and wood exploitations (Rodrigues et al., 2004). This process began in the 1960's and has been more intense in recent years, with the destruction of large areas of primary forest creating a landscape characterized by forest fragments at different successive stages, under strong pressure from man and with serious problems in preserving biodiversity (Vieira et al., 1998; Gascon et al., 2001).

Schizolobium amazonicum Huber ex. Ducke is a native woody legume from the Amazonian forest belonging to the Fabaceae family (subfamily Caesalpinoideae) (APG II, 2003) and is a non-nodulating tree. *S. amazonicum* grow fast and it is a big tree (20

to 30 m high and 1 m of diameter), occurring in dry land forest (Ducke, 1949). This legume tree has been replanted in agroforestry systems that were cleared from primary rain forest in the 1970s and 1980s in favor of pasture. Today it is an important source of wood to supply the local industry of wood sheet for the furniture industry in many countries. The cultivated areas with *S. amazonicum* have increased each year, due to the excellent plant characteristics such as good seed source in quality and amount, fast growth, wood density and low disease and pest incidence. In addition, *S. amazonicum* is a good C sequester. The dynamic of total above ground biomass sequestration potential for *S. amazonicum* plantations ranged from 134 to 366 ton ha⁻¹, considering two different stand densities (300 and 450 trees ha⁻¹) and using selected biomass equations and an average biomass expansion factor (BEF) of 1.3 suggested by Brown (1997) for tropical broadleaf plantations. An average total biomass of about 209 ton ha⁻¹ is reached after 15 years.

The planting system is low tech and needs to be developed to improve the wood production by *S. amazonicum* and its quality. Currently, a few papers are found in the literature related with wood production. Rondon (2002) studied the influence of different population density and spacing on plant growth, and found that the spacing of 4 x 4 m produced more biomass. Lima et al. (2003) evaluated different doses of boron and found that 0.15 mg dm⁻³ showed more effect on plant growth. *S. amazonicum* is largely regenerated by planting seedling into the soil. Seeds are also used in reforestation but in small areas when compared with to seedlings areas. Despite the low fertility conditions of soil, and the small number of native arbuscular mycorrhiza fungi (AM) propagules, could influence the survival of seedlings and plant growth in the field conditions.

Most genera of the Leguminosae family can nodulate and fix nitrogen, although there are some important exceptions (Sprent, 2001). However, *S. amazonicum* is a non-nodulating legume tree, but would benefit from microbial interaction besides

Rhizobium. Other microorganisms may also benefit plants by means of free-living nitrogen fixation, phosphate solubilization or phytohormones production (Artursson et al., 2006). Some of these microorganisms are bacteria so-called plant-growth promoting rhizobacteria (PGPR) (Artursson et al., 2006; Dobbelaere et al., 2003) and are able to stimulate plant growth mainly due to phytohormones production.

AM fungi are of widespread occurrence and may represent the natural status of most tropical plant species especially in the successive groups such as pioneer and early secondary (Zangaro et al., 2003). Furthermore, legume trees can establish mutual symbiosis with AM fungi, which may result in reciprocal transfer of P from the fungus to the plant in exchange for carbon from the plant to the fungus and improved growth of tropical woody leguminous plants (Zangaro, 2003). Dual inoculation of legume trees with rhizobia or other plant growth promoting bacteria and AM fungi can increase plant growth (Abd-Alla et al., 2000). In Brazil, Franco and Faria (1997) have studied nodulation and mycorrhizal association in legume trees to restore vegetation in poor or depleted soils with the goal of restoring their fertility. However, little information is available about symbiotic relationships of dual inoculation in native Brazilian legume trees, especially *S. amazonicum* a non-nodulating legume tree.

The aim of our study was to investigate the interaction between nitrogen fixing bacteria and AM fungi and their effects on plant growth and wood production of *S. amazonicum* in a field conditions at the Southeastern of Pará State.

Material and methods

Experimental design

The experiment was carried out at Dom Eliseu County - Pará State from January 2005 to February 2006. The climate in the region is characterized as hot and wet with a dry period in the winter and a rainy summer (Köeppen climatic type is AM). The mean

rainfall varies from 1800 to 2300 mm. The soil in the experimental area is a Xanthic Ferralsol according to the FAO (1990) classification, 'Latossolo Amarelo', according to Brazilian classification. The original vegetation in the study area was cleared from primary rain forest in 1970s until 1980s in favor of pasture, and this area was abandoned, and secondary growth began to develop. In 2003, the secondary growth was cut and burned and the area has since then been used for experiments and planting of *S. amazonicum*.

Two plantation systems (seed and seedlings) were assessed. In each system, three N fixing bacteria [*Rhizobium* sp. strain BR4406 (Rhi1), *Rhizobium* sp. strain BR4407 (Rhi2) and *Burkholderia* sp. strain (LEM6)] and three AM fungi [*Glomus clarum* (Gc), *G. etunicatum* (Ge) and *G. intraradices* (Gi)]. with five blocks (16 x 160 m) were assessed. The treatments in each block were arranged in a completely random design (3 N-fixing bacteria strains x 3 AM fungi) and their respective controls. Each block was composed by four rows and each rows had forty plants that corresponded to four treatments per row with ten plants. The plants were arranged in spaces of 4 x 4 m among plants and rows; between block the space was 8 m.

In this experiment the parameters evaluated were diameter at soil surface (DSS), total height (TH), height of until the first leaf (HFL), number of leaves, biomass (area . breast height . 0.80), survival (%) and wood production (biomass . % death . 2.5).

Data were evaluated by analyses of variance (ANOVA). The Tukey's Honest significant difference (HSD) tests were performed at $P \leq 0.05$ level of probability.

Substrate and plant

The soil in the experimental area is Xanthic Ferralsol with the following chemical composition: pH (CaCl₂) 4.8; H+Al 2.9 cmol_c dm⁻³, Al³⁺ 0.2 cmol_c dm⁻³; Ca²⁺ 3.3 cmol_c dm⁻³, Mg²⁺ 1.0 cmol_c dm⁻³, K⁺ 0.24 cmol_c dm⁻³; P 10.0 mg dm⁻³, C 19.0 g dm⁻³; S-SO₄²⁻ 4.2 mg dm⁻³, Na⁺ 4.0 mg dm⁻³, B 0.3 mg dm⁻³, Fe²⁺ 99.0 mg dm⁻³, Mn 7.3 mg dm⁻³, Cu 0.2 mg dm⁻³, Zn 3.0 mg dm⁻³.

The seeds of *S. amazonicum* were collected at the native forest at the Pará state where the tree occurs naturally. Before sowing the seeds were scarified in one extremity by mechanical worn. In the seed system, two seeds were sown in each well and thinned one seedling after one month. For the seedling system one 30 days-old plantlet (cultivated in a nursery in plastic bags with 1000 mL with non sterile soil) was planted before taken out of the plastic bag.

Bacteria inoculum

The bacterial strains used as inoculum were two *Rhizobium* sp isolated from nodules of legume tree (BR4406 and BR4407) supplied by EMBRAPA - Agrobiologia collection and one free living N-fixing *Burkholderia* sp. strain from our own collection named LEM6 (Albino et al., 2006).

The strains of *Rhizobium* sp. were grown in Petri dishes with TY media (Stanghelli et al., 1977) and the *Burkholderia* sp strain in Nfb media (Döbereiner and Day, 1976). The bacterial strains were inoculated and incubated at 28°C 72 h⁻¹. In the field, bacteria were re-suspended in sterile saline solution (NaCl 0.85 %) plus carboxymethylcellulose (0.5%). The final cell concentration for each bacteria inoculum was approximately 10¹⁰ colony forming unit (CFU mL⁻¹) adjusted by visual comparison between CaCO₃ solution standard and cells suspension for each strain. The seeds were inoculated before sowing by immersion in a bacterial suspension and seedlings were inoculated with 10 mL of the same bacterial suspension around the plant after planted.

AM fungi inoculum

Three AM fungi, were used as inoculum *G. clarum*, *G. etunicatum* and *G. intrarradices*. All inocula are from our own collection and are maintained in pots with *Brachiaria decumbens* as host plants. Ten grams of inoculum were added in the wells containing colonized roots, spores and mycelia before seed and plantlet were planted.

After adding the inoculum, it was covered with a soil layer (aprox. 2 cm) and then the sowing began.

Results

In spite of the fact that the measures were made monthly, we are showing the last two evaluations which correspond to 210 and 390 days after the experiment's installation.

After 210 days of sowing, plants inoculated with *G. intrarradices* without bacteria showed greater DSS when compared with others treatments and no significant differences were observed in TH. On the other hand, plants inoculated with *G. etunicatum* without bacteria showed higher HFL when compared with *G. etunicatum* associated with Rhi 2 strain, but no differences were observed among AM fungi treatments (Table 1). There were no differences on the number of leaves, but plants inoculated only with *G. intrarradices* had the biggest biomass when compared with other treatments (Table 1). All treatments had more survival when compared with control, except for plants inoculated with *G. clarum* plus LEM6, which did not differ from the control (Figure 1A). Plants inoculated with *G. intrarradices* and with an absence of bacteria showed the best wood production when compared with the other treatments (Figure 1B).

At 390 days after sowing the DSS, only *G. intrarradices* without bacteria differs to the control, and in the others treatments with dual inoculation, LEM 6 strain plus *G. etunicatum* and *G. intrarradices* did not differed to the control but was bigger than *G. intrarradices* with LEM 6. The strain Rhi2 plus AM fungi showed more DSS when compared with control. AM fungi alone increased TH when compared with control plants. When the bacteria and AM fungi were present, *G. clarum* plus LEM 6 decreased TH when compared with other AM and LEM 6. With Rhi 1 strain, the

interaction with AM fungi increased TH. On the other hand the interaction with AM fungi and Rhi 2 did not show any effect on TH. When bacteria were inoculated, with or without AM fungi, no differences were found when compared with the control, except for Rhi1 strains which stimulated total height when co-inoculated with *G. clarum*. HFL was stimulated when the AM fungi and LEM6 or Rhi2 were co-inoculated. The interaction between bacteria and AM species did not affect the number of leaves. However, all species of *Glomus* and all bacterial strains showed effect on leaves numbers when they were inoculated alone. Biomass was still increased by *G. intrarradices* inoculated alone, but at 390 days this AM species also improved biomass when interacting with Rhi2 (Table 2). Plant survival showed the same results observed at 210 days, where non-inoculated plants and *G. clarum* plus LEM6 treatment showed the lowest level of survival when compared with other treatments (Figure 2A). Also, the same tendency was observed in wood productivity, where the three treatments caused less wood production at 210 days, with the same effect at 390 days (Figure 2B).

In the areas where seedlings were employed, the treatments showed different effects when compared with seeds. At 210 days, the DSS of seedlings was not influenced by AM fungi, but when plants were inoculated with *G. intrarradices* plus Rhi1, they showed significant differences when compared with the non-AM plants. In TH and HFL no differences were observed at this time and no differences were observed in the number of leaves. In relation to Biomass, only the dual inoculation *G. intrarradices* plus Rhi1 increased biomass when compared with *G. intrarradices* plus LEM 6 (Table 3). Plant survival was increased by *G. etunicatum* plus Rhi1 and *G. intrarradices* plus Rhi2 when compared with non-inoculated plants. Seedlings inoculated with *G. clarum* plus LEM6 strain showed lower plant survival than was observed when using seeds (Figure 3A). At 210 days the wood productivity did not show significant differences among treatments when compared with control in seedlings planted area (Figure 3B).

In contrast to what occurred in the sowed area, where the treatment with *G. clarum* plus LEM6 did not show any stimulatory effect, and in some cases had suppressive effects, in plantlet at 390 days the DSS of plants inoculated with *G. clarum* plus LEM6 showed significant differences when compared with bacteria control. Also, the same treatment had significant differences in TH and HFL when compared with the bacteria control. Again, *G. etunicatum*, when co-inoculated with LEM6, increased the number of leaves, when comparing with the non-AM plants. The plant biomass was also increased by *G. clarum* plus LEM6 (Table 4). The seedlings survival had not significant differences (Figure 4A) and wood production was increased only in plants inoculated with *G. clarum* and Rhi1 (Figure 4B), in composition to plants inoculated with *G. clarum* or Rhi1 separately.

Discussion

Soil erosion and disturbance results in reduction of microbial community including AM propagules which can be critical for plant growth because AM symbiosis and others microorganisms are key biological components in a tropical rainforest ecosystem (Matsumoto et al., 2005). A low density of AM propagules normally limits the establishment of native plants and plant growth. Regarding to *S. amazonicum*, it was necessary to use effective and ineffective AM fungi and N-fixing bacteria, in order to enhance the ability of the plant to become established and to cope with stress situations such as nutrient limitation and/or imbalance.

Specific rhizospheric microorganisms are also important and can play a relevant role in promoting root growth and mycorrhizal development, facilitating plant performance in a tropical agroforestry system. This could be critical for optimal establishment of plants in these areas (Patrese and Cordeiro, 2004; Zangaro et al.,

2003). Nevertheless, there are few reports describing the beneficial effects of PGPR on performance of woody legumes in tropical agroforestry systems.

The different methods used for sowing showed differences on plant growth when we compared the treatments. When seeds were inoculated the AM fungi was more efficient to improve plant growth than N-fixing bacteria, similar results were also observed when dual inoculation was employed. In nursery conditions, Patrese and Cordeiro (2004) found different responses to the inoculation of AM fungi and *Rhizobium* in three species of woody tropical legume. In the same study, the authors suggested that specific species of AM fungi should be selected to use in a dual inoculation with *Rhizobium* to stimulate plant growth. In the area in which seeds were employed for reforestation, the most effective AM fungi inoculum in all parameters evaluated was *G. intrarradices* inoculated alone.

In the area reforested with seedlings, the treatment showed different effects when compared with our observations in the sowing method. In this system plantation, the dual inoculation showed to be more effective. In this case, *G. intrarradices* increased DSS and plant survival, only when co-inoculated with Rhi1 and Rhi2 respectively. In seedling area, *G. clarum* and *G. etunicatum* also improved plant growth, but always associated with the *Rhizobium* strains at 210 days and LEM 6 and Rhi 1 at 390 days.

The differences found between planting systems is very interesting, because the results indicated that effectiveness of bacterial and/or AM fungi inoculum depends on how the system is used. Despite the fact that *S. amazonicum* is a non-nodulating legume and, *Rhizobium* is a symbiotic bacterium, that in many cases may act as PGPR (Galleguillos et al., 2000; Valdenegro et al., 2001). On the other hand, the free living N fixing bacteria LEM 6 strain (*Burkholderia* sp.) increased tree growth in field conditions, and the similar results were also observed in other woody species (Heinonsalo et al., 2004) and rice (Raimam et al., 2007) in green-house conditions. The positive effects on plant growth observed in seedling reforested area by bacterium inoculation should be

involved with the presence of roots which improve nutrients into the rhizosphere microcosm, and support the establishment of bacterial inoculum (Andrade, 2004). It is largely known that roots exude supply nutrients to the microbial community and AM fungi influence its composition both qualitative and quantitatively (Andrade et al., 1997 ; Andrade et al., 1998). It is probable that the presence of roots and AM fungi improved the bacterial inoculum efficiency, as we found in the area reforested with seedlings. Also, positive impacts of dual inoculation have been demonstrated in forest tree species in Philippines (De La Cruz *et al.* 1988), India (Khan & Uniyal 1999) and Kenya (Munro *et al.* 1999).

The bacteria strains population probably decreased or disappeared during the time of the experiment, but the effect observed in bacteria treatment every time was associated with AM inoculation. This fact suggested that AM effect is more representative than bacteria effect, and certainly the mycorrhizosphere effect was involved and stimulated indigenous bacteria population. The mycorrhizosphere effect change exudates and improve the activity of microbial community around the AM roots (Linderman, 1988), this effect could be involved on the plant growth observed in the *S. amazonicum* in a field conditions.

When plants are inoculated, the methods of cultivation, the bacterium inoculum and mycorrhizal symbiosis status can affect the success of plant establishment, particularly when the trees are destined to tropical low fertility soils in agroforestry systems.

We suggest previous testing to check microbial efficiency for each woody species to select the most efficient microorganisms to improve plant growth. To achieve these aims, previous testing with selected microorganisms with specific soils and plants is needed. The growth-stimulating effect of combined microbial inoculations can be much greater than individual inoculants.

References

- Abd-Alla, M.H., Omar, S.A., Karanxha, S., 2000. The impact of pesticides on arbuscular mycorrhizal and nitrogen-fixing symbioses in legumes. *Appl. Soil Ecol.* 14, 191–200.
- Albino; U., Saridakis; D. P., Ferreira; M. C., Hungria; M., Vinuesa; P., Andrade, G., 2006. High diversity of diazotrophic bacteria associated with the carnivorous plant *Drosera villosa* var. *villosa* growing in oligotrophic habitats in Brazil. *Plant Soil* 287, 199-207.
- Andrade, G., 2004. Role of functional groups of microorganisms on the rhizosphere microcosm dynamics. In: Varma; A., Abbott; L., Werner; D., Hampp, R. (Eds.). *Plant surface microbiology*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 51-69.
- Andrade, G., Mihara, K.L., Linderman, R.G., Bethlenfalvay, G.J., 1997. Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 192, 71-79
- Andrade, G., Linderman, R.G., Bethlenfalvay, G.J., 1998. Bacterial associations with the mycorrhizosphere and hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* *Plant Soil* 202, 79-87.
- APG – Angiosperm phylogeny group II. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APGII. *Botanical J. Linn. Soc.* 141, 399-436.
- Artusoon V., Finlay, R.D., Jansson, J.K., 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environ. Microbiol.* 8, 1-10.
- Brow, S., 1997. Estimation biomass and biomass change of tropical forest, a primary. *FAO Forestry paper No 134*. Fao, Rome, 55 pp.

- De La Cruz, R.E.; Manalo, M.Q.; Aggangan, N.S., Tambalo, J.D., 1988. Growth of three legume trees inoculated with VA mycorrhizal fungi and *Rhizobium*. *Plant Soil* 108, 111-115.
- Ducke, A., 1949. Notas sobre a flora neotrópica II: As leguminosas da Amazônia brasileira. Belém, IAN Boletim Técnico 18, 248 p. Belém.
- Dobbleare, S.; Vanderleyden, J.; Okon, Y., 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Cr. Rev. Plant Sci.* 22, 107-149.
- FAO, 1994. Soil map of the world. Revised legend with corrections. FAO/UNESCO, Rome, 140pp.
- Franco, A.A.; Faria, S.M., 1997 The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biol. Biochem.* 29, 897-903.
- Galleguillos, C., Aguirre, C., Barea, J.M., Azcón, R., 1998. Growth promoting effect of two *Sinorhizobium meliloti* strains (a wild type and its genetically modified derivative) on a non-legume plant species in specific interaction with two arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 204, 57-67.
- Gascon, C., Bierregard Jr., R.O., Laurence, W., Rankin-De Mérona, J., 2001. Deforestation and forest fragmentation in the Amazon. In: Bierregard Jr., R.O., Gascon, C., Lovejoy, T.E., Mesquita, R.C.G. (Eds.). *Lessons from Amazonia: The Ecology and Conservation of a Fragmented Forest*. Yale University Press, New Haven, London, pp. 21–30
- Galleguillos, C., Aguirre, C., Barea, J.M., Azcón, R., 2000. Growth promoting effect of two *Sinorhizobium meliloti* strains (a wild type and its genetically modified derivative) on a non-legume plant species in specific interaction with two arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Sci.* 159, 57-63.
- Heinonsalo, J., Frey-Klett, P., Pierrat, J.C., Churim, J.L., Vairelles, D., Garbaye, J., 2004. Fate tree growth effect and potential impact on soil microbial communities of mycorrhizal and bacterial inoculation in a forest plantation. *Soil. Biol. Biochem.* 36, 211-216.

- Khan, S.N., Uniyal, K., 1999. Growth response of two forest tree species to VAM and *Rhizobium* inoculations. *Indian Forester* 125, 1125-1128.
- Lima, S.F., Cunha, R.L., Carvalho, J.G., Souza, C.A.S., Corrêas, F.L.O., 2003. Comportamento do Paricá (*Schizolobium amazonicum* Herb.) submetido à aplicação de doses de boro. *Cerne*, 9,192-204.
- Matsumoto, L.S., Martines, A.M., Avanzi, M.A., Albino, U.B., Brasil, C.B., Saridakis D.P., Rampazo L.G.L, Zangaro W., Andrade G., 2005. Interactions among functional groups in the cycling of carbon, nitrogen and phosphorus in the rhizosphere of three successional species of tropical woody trees. *Appl. Soil Ecol.* 28, 57-65.
- Munro, R.C.; Wilson, J.; Jefwa, J., Mbutia, K.W., 1999. A low-cost method of mycorrhizal inoculation improves growth of *Acacia tortilis* seedlings in the nursery. *For. Ecol. Manag.*, 113, 51-56.
- Patreze, C.M., Cordeiro, L., 2004. Nitrogen-fixing and vesicular–arbuscular mycorrhizal symbioses in some tropical legume trees of tribe Mimoseae. *Forest. Ecol. Manage.* 196: 275-285.
- Pinard, M.A., Barker, M.G., Tay, J., 2000. Soil disturbance and post-logging forest recovery on bulldozer paths in Sabah, Malaysia. *For. Ecol. Manage.* 130, 213–225.
- Raimam, M. P., Albino, U., Cruz, M.F., Lovato, G.M., Spago, F., Ferracin, T.P., Lima, D.S., Goulart, T., Bernardi, C.M., Miyauchi, M., Nogueira, M.A., Andrade, G., 2007. Interaction among free-living N-fixing bacteria isolated from *Drosera villosa* var. *villosa* and AM fungi (*Glomus clarum*) in rice (*Oryza sativa*). *Appl. Soil Ecol.* 34, 25-34.
- Rodrigues, R.R., Martins, S.V., Barros, L.C., 2004. Tropical Rain Forest regeneration in an area degraded by mining in Mato Grosso State, Brazil *For. Ecol. Managem.* 190, 323–333.

- Rondon, E.V. 2002. Produção de biomassa e crescimento de árvores de *Schizolobium amazonicum* (Huber) Ducke sob diferentes espaçamentos na região de mata. *Revista Árvore*, 26, 573-576
- Sprent, J.I., 2001. Nodulation in Legumes. Royal Botanic Gardens, Kew, 146 pp.
- Valdenegro, M., Barea, J.M, Azcón, R., 2001. Influence of arbuscular-mycorrhizal fungi, *Rhizobium meliloti* strains and PGPR inoculation on the growth of *Medicago arborea* used as model legume for re-vegetation and biological reactivation in a semi-arid Mediterranean area. *Plant Gr. Reg.* 34, 233-240.
- Vieira, G., Brandão, M.J., Blair, C., 1998. Ecofisiologia do estabelecimento de plântulas de espécies florestais da Amazônia. In: Higuchi, N., Campos, M.A.A., Sampaio, P.T.B., Santos, J. (Eds.), Pesquisas florestais para a conservação da floresta e reabilitação de áreas degradadas da Amazônia. INPA, Manaus, pp. 153–170.
- Zangaro, W., Nisizaki, S.M.A., Domingos, J.C.B. and Nakano, E.M., 2003. Mycorrhizal response and successional status in 80 woody species from south Brazil. *J. Trop. Ecol.*, 19, 315-324.

Table 1. Effects of PGPR *Burkholderia* sp strain (LEM 6) and *Rhizobium* strains (Rhi 1 or Rhi 2) and AM fungi (*G. clarum*, *G. etunicatum* and *G. intrarradices*) on stem diameter on soil surface (DSS), total height (TH), height until first leaf (HFL), total number of leaves and biomass of *S. amazonicum* at 210 days after sowing. Means (n = 50) sharing the same letter are not significantly different according to Tukey HSD test (P < 0.05). The small letters compare among AM fungi treatments and capital letters compare among bacterial treatment.

AM fungi	Bacteria strains			
	Non-bacteria	LEM6	Rhi1	Rhi2
DSS (mm)				
Non-AM	28.47bA	28.12aA	28.64aA	25.47aA
Gc	29.38bA	24.80aA	31.83aA	27.64aA
Ge	27.70bA	30.19aA	28.15aA	27.86aA
Gi	36.19aA	28.42aB	29.16aB	31.13aAB
TH (cm)				
Non-AM	112.02aA	118.82abA	114.41aA	100.23aA
Gc	123.02aA	97.64bB	132.47aA	114.17aAB
Ge	112.02aA	125.35aA	114.93aA	107.11aA
Gi	126.94aA	114.22abA	118.17aA	123.61aA
HFL (cm)				
Non-AM	63.95aA	65.32aA	64.12aA	58.88aA
Gc	63.45aA	59.32aA	64.05aA	66.75aA
Ge	70.55aA	68.40aAB	61.84aAB	58.63aB
Gi	64.81aA	61.25aA	65.05aA	64.89aA
No leaves				
Non-AM	7.72aA	7.85aA	7.59aA	7.02aA
Gc	8.21aA	7.25aA	8.23aA	7.78aA
Ge	7.19aA	7.78aA	7.80aA	7.44aA
Gi	8.24aA	7.80aA	7.28aA	7.68aA
Biomass (dm³)				
Non-AM	0.82bA	0.69aA	0.78aA	0.53aA
Gc	0.81bA	0.46aA	0.97aA	0.68aA
Ge	0.61bA	0.83aA	0.68aA	0.64aA
Gi	1.72aA	0.69aB	0.76aB	0.90aB

Table 2. Effects of PGPR *Burkholderia* sp strain (LEM 6) and *Rhizobium* strains (Rhi 1 or Rhi 2) and AM fungi (*G. clarum*, *G. etunicatum* and *G. intrarradices*) on stem diameter on soil surface (DSS), total height (TH), height until first leaf (HFL), total number of leaves and biomass of *S. amazonicum* at 390 days after sowing. Means (n = 50) sharing the same letter are not significantly different according to Tukey HSD test (P < 0.05). The small letters compare among AM fungi treatments and capital letters compare among bacterial treatment.

AM fungi	Bacteria strains			
	Non-bacteria	LEM6	Rhi1	Rhi2
DSS				
Non-AM	57.22bAB	62.64abA	61.97aA	52.97bB
Gc	64.30abAB	56.89bB	68.82aA	64.05aAB
Ge	63.23abA	64.74aA	64.57aA	61.86aA
Gi	66.38aA	66.38aA	64.32aA	65.09aA
TH (cm)				
Non-AM	292.51bAB	318.76abAB	337.53bA	273.23aB
Gc	353.70aA	302.03bA	395.38aA	340.61aA
Ge	349.18aA	358.02aA	357.03abA	312.92aA
Gi	364.97aA	357.21aA	352.92abA	368.23aA
HFL (cm)				
Non-AM	134.00aAB	124.28bA	146.46aA	112.50bB
Gc	147.03aA	143.52abB	171.10aA	148.35aAB
Ge	149.70aA	158.70aA	152.07aA	141.44aA
Gi	155.44aA	156.70aA	150.69aA	159.71aA
N leaves				
Non-AM	17.28bB	21.33aA	21.11aA	17.46bA
Gc	22.72aA	20.10aA	23.30aA	21.55aA
Ge	22.12aA	21.94aA	21.96aA	21.04aA
Gi	22.95aB	22.67aA	21.48aA	21.80aA
Biomass (dm³)				
Non-AM	7.57bAB	8.61abAB	9.44aA	6.38bB
Gc	10.03abAB	7.06bB	12.67aA	9.70abAB
Ge	9.42abA	10.12abA	10.13aA	8.62abA
Gi	11.08aA	10.70aA	10.04aA	10.91aA

Table 3. Effects of PGPR *Burkholderia* sp strain (LEM 6) and *Rhizobium* strains (Rhi 1 or Rhi 2) and AM fungi (*G. clarum*, *G. etunicatum* and *G. intrarradices*) on stem diameter on soil surface (DSS), total height (TH), height until first leaf (HFL), total number of leaves and biomass of *S. amazonicum* at 210 days after seedling planting. Means (n = 50) sharing the same letter are not significantly different according to Tukey HSD test (P < 0.05). The small letters compare among AM fungi treatments and capital letters compare among bacterial treatment.

AM fungi	Bacteria strains			
	Non-Bacteria	LEM6	Rhi1	Rhi2
DSS (mm)				
Non-AM	30.68aA	26.71aA	26.75bA	29.30aA
Gc	26.63aA	30.61aA	32.24abA	29.21aA
Ge	31.06aA	28.81aA	31.29abA	30.64aA
Gi	28.86aB	25.54aB	36.58aA	28.74aB
TH (cm)				
Non-AM	132.55aA	106.37abA	113.06aA	110.41aA
Gc	111.52aA	132.87aA	135.02aA	119.16aA
Ge	136.57aA	123.30abA	128.24aA	118.86aA
Gi	114.43aA	101.83bA	115.55aA	117.76aA
HFL (cm)				
Non-AM	71.74aA	64.27aA	71.36aA	64.41aA
Gc	67.65aA	75.68aA	72.78aA	72.67aA
Ge	71.34aA	68.21aA	74.79aA	68.50aA
Gi	66.13aA	66.25aA	76.08aA	69.64aA
No leaves				
Non-AM	8.16aA	7.78aA	7.57aA	8.05aA
Gc	7.13aB	8.06aAB	8.89aA	7.90aAB
Ge	8.34aA	9.04aA	8.28aA	8.44aA
Gi	7.94aA	7.38aA	7.27aA	8.64aA
Biomass (dm³)				
Non-AM	0.99aA	0.60aA	0.67aA	0.81aA
Gc	0.63aA	1.08aA	1.09aA	0.78aA
Ge	1.00aA	0.74aA	1.01aA	0.88aA
Gi	0.79aAB	0.55aB	1.17aA	0.74aAB

Table 4. Effects of PGPR *Burkholderia* sp strain (LEM 6) and *Rhizobium* strains (Rhi 1 or Rhi 2) and AM fungi (*G. clarum*, *G. etunicatum* and *G. intrarradices*) on stem diameter on soil surface (DSS), total height (TH), height until first leaf (HFL), total number of leaves and biomass of *S. amazonicum* at 390 after seedling planting. Means (n = 50) sharing the same letter are not significantly different according to Tukey HSD test (P < 0.05). The small letters compare among AM fungi treatments and capital letters compare among bacterial treatment.

AM fungi	Bacteria strains			
	Non-bacteria	LEM6	Rhi1	Rhi2
DSS (mm)				
Non-AM	63.79aA	58.83aA	63.65aA	60.20aA
Gc	57.51aB	66.62aA	65.66aAB	62.39aAB
Ge	64.46aA	64.60aA	65.66aA	62.39aA
Gi	64.14aA	61.62aA	61.44aA	63.40aA
TH (cm)				
Non-AM I	358.36aA	320.81bA	354.00aA	305.77aA
Gc	303.45bB	382.81aA	369.54aAB	351.00aAB
Ge	370.40aA	367.82abA	341.91aA	357.96aA
Gi	354.60abA	327.73bA	341.16aA	342.87aA
HFL (cm)				
Non-AM	162.10abA	138.39bA	153.10aA	137.18aA
Gc	144.74bB	173.48aA	174.82aA	156.63aAB
Ge	172.73aA	162.17abA	155.83aA	163.17aA
Gi	159.30abA	144.56bA	149.25aA	156.62aA
N leaves				
Non-AM	22.90aA	18.45bA	21.15aA	18.40aA
Gc	19.41aA	23.44abA	21.57aA	21.77aA
Ge	21.33aA	24.07aA	24.81aA	22.55aA
Gi	21.50aA	19.86abA	22.51aA	21.34aA
Biomass (dm³)				
Non-AM	10.03aA	8.03bA	9.32aA	7.90aA
Gc	7.08aB	11.97aA	11.53aA	9.51aAB
Ge	10.77aA	10.52abA	9.64aA	10.97aA
Gi	10.23aA	8.67abA	9.07aA	9.46aA

Figures legend

Figure 1. Effect of PGPR bacteria, *Burkholderia* sp strain (LEM 6) and *Rhizobium* strains (Rhi 1 or Rhi 2) and AM fungi (*G. clarum*, *G. etunicatum* and *G. intrarradices*) on *S. amazonicum* at 210 days after sowing. (A) Survival and (B) wood production. Bar represent the stand error of mean values (n = 50). Means sharing different letters are statistically different at $P < 0.05$ by Tukey HSD test.

Figure 2. Effect of PGPR bacteria, *Burkholderia* sp strain (LEM 6) and *Rhizobium* strains (Rhi 1 or Rhi 2) and AM fungi (*G. clarum*, *G. etunicatum* and *G. intrarradices*) on *S. amazonicum* at 390 days after sowing. (A) Survival and (B) wood production. Bar represent the stand error of mean values (n = 50). Means sharing different letters are statistically different at $P < 0.05$ by Tukey HSD test..

Figure 3. Effect of PGPR bacteria, *Burkholderia* sp strain (LEM 6) and *Rhizobium* strains (Rhi 1 or Rhi 2) and AM fungi (*G. clarum*, *G. etunicatum* and *G. intrarradices*) on *S. amazonicum* at 210 days after seedlings planting. (A) Survival and (B) woody production. Bar represent the stand error of mean values (n = 50). Means sharing different letters are statistically different at $P < 0.05$ by Tukey HSD test.

Figure 4. Effect of PGPR bacteria, *Burkholderia* sp strain (LEM 6) and *Rhizobium* strains (Rhi 1 or Rhi 2) and AM fungi (*G. clarum*, *G. etunicatum* and *G. intrarradices*) on *S. amazonicum* at 390 days after seedlings planting. (A) Survival and (B) woody production. Bar represent the stand error of mean values (n = 50). Means sharing different letters are statistically different at $P < 0.05$ by Tukey HSD test.

Figure 1

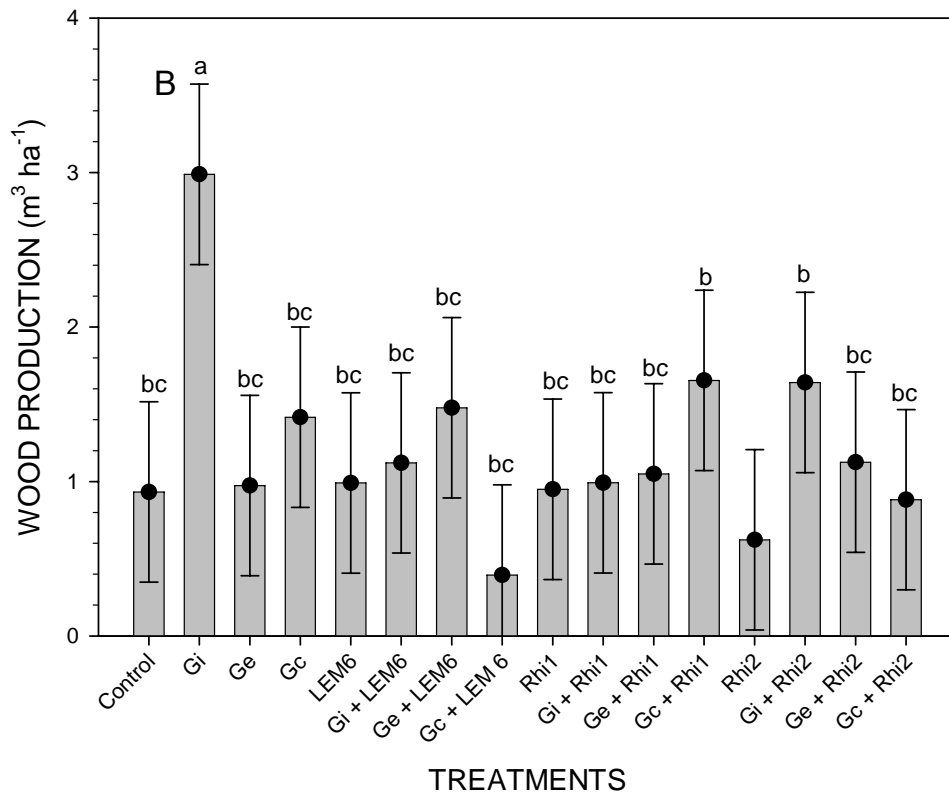
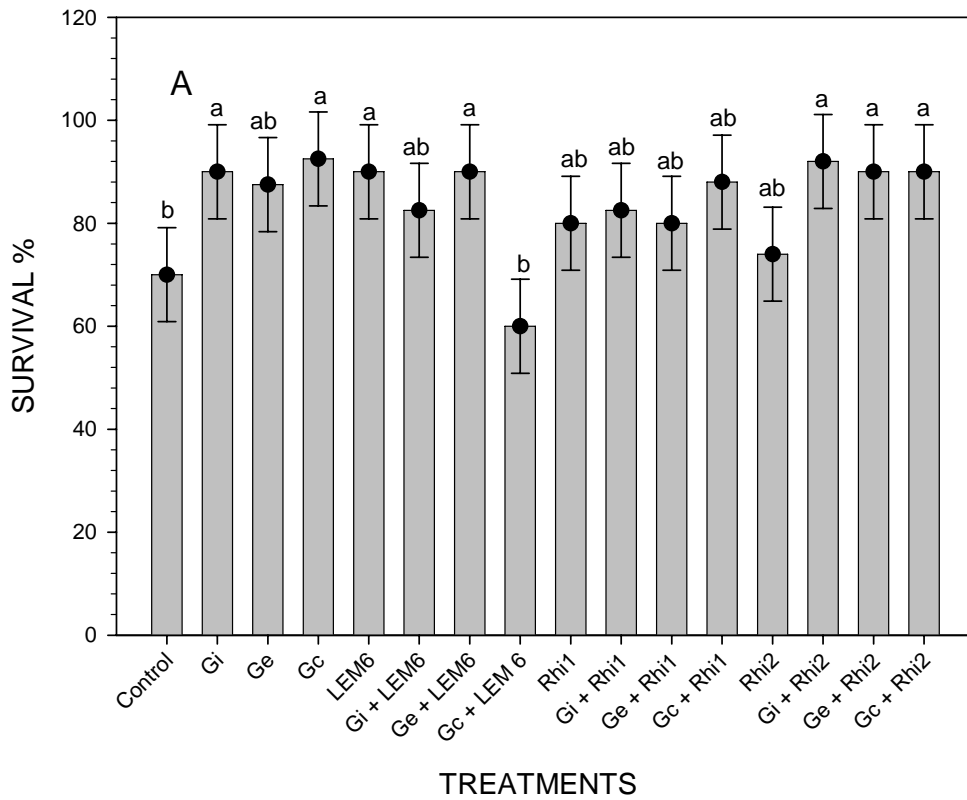


Figure 2

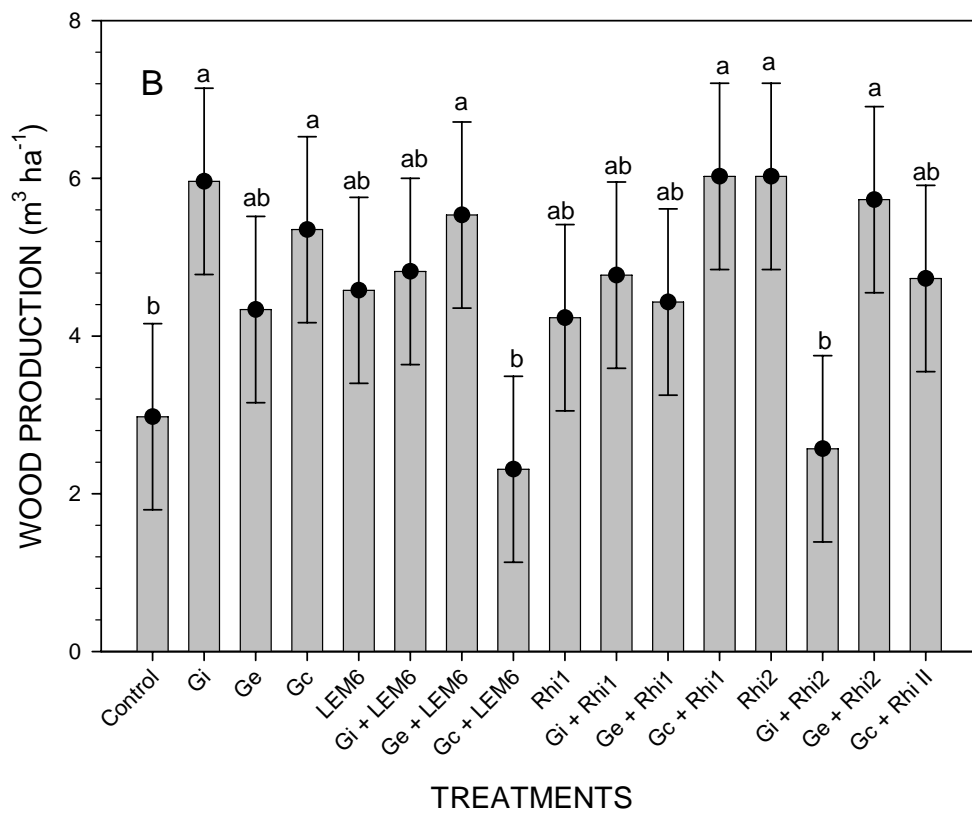
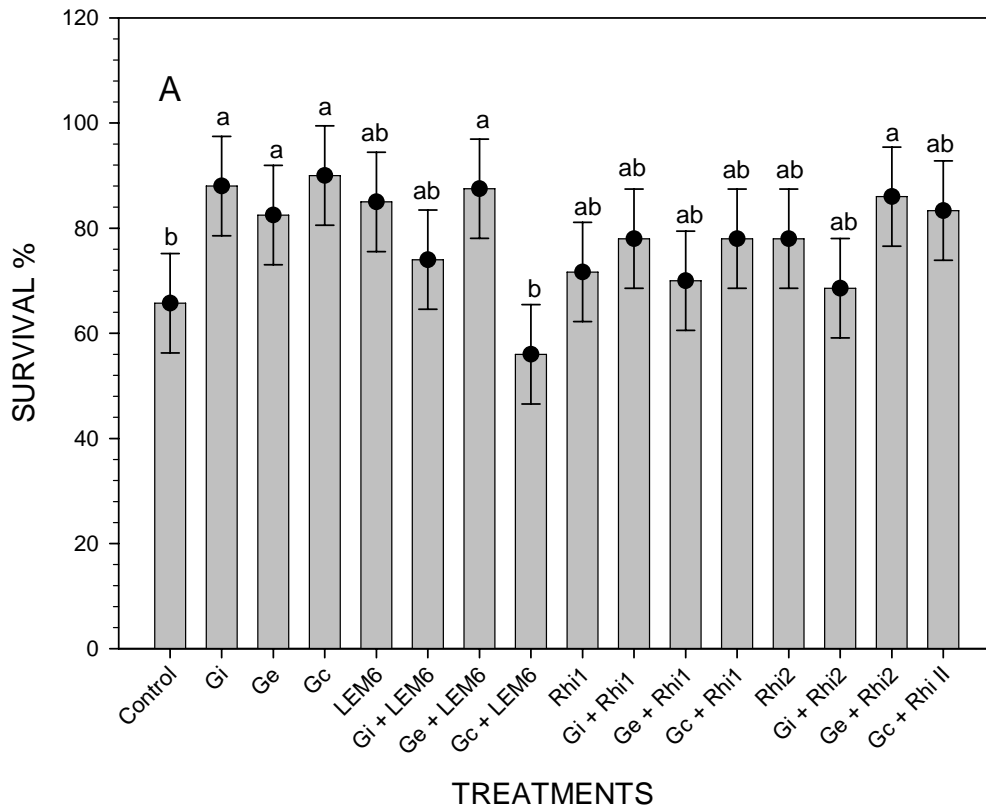


Figure 3

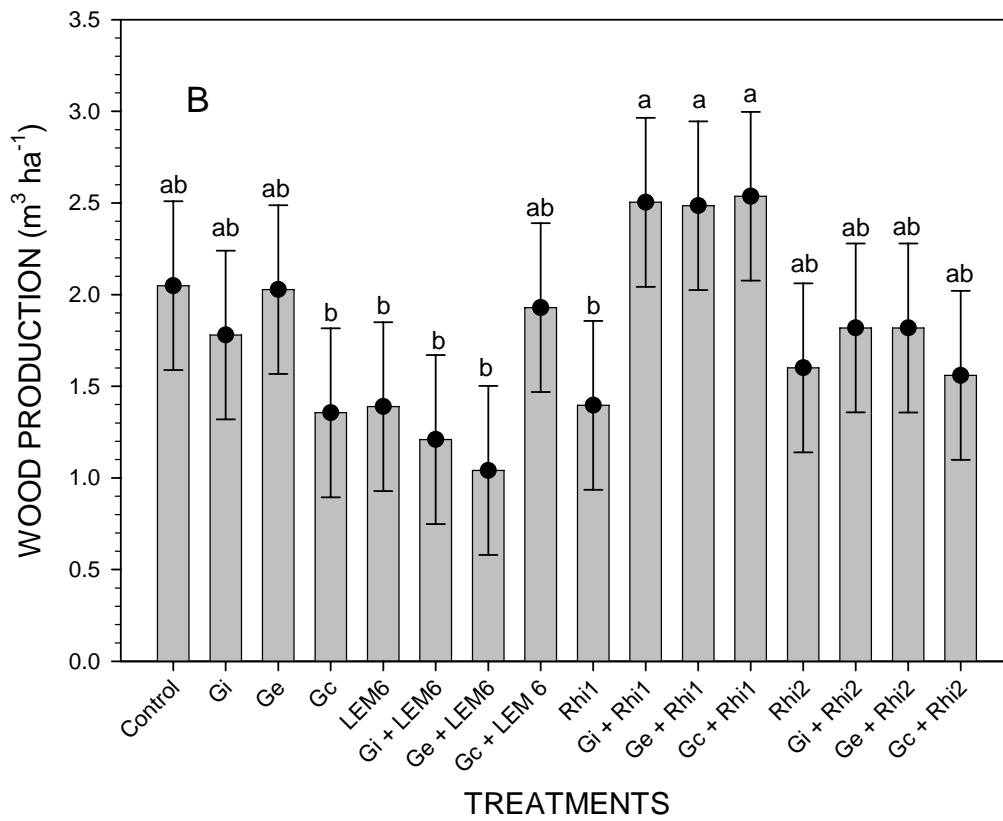
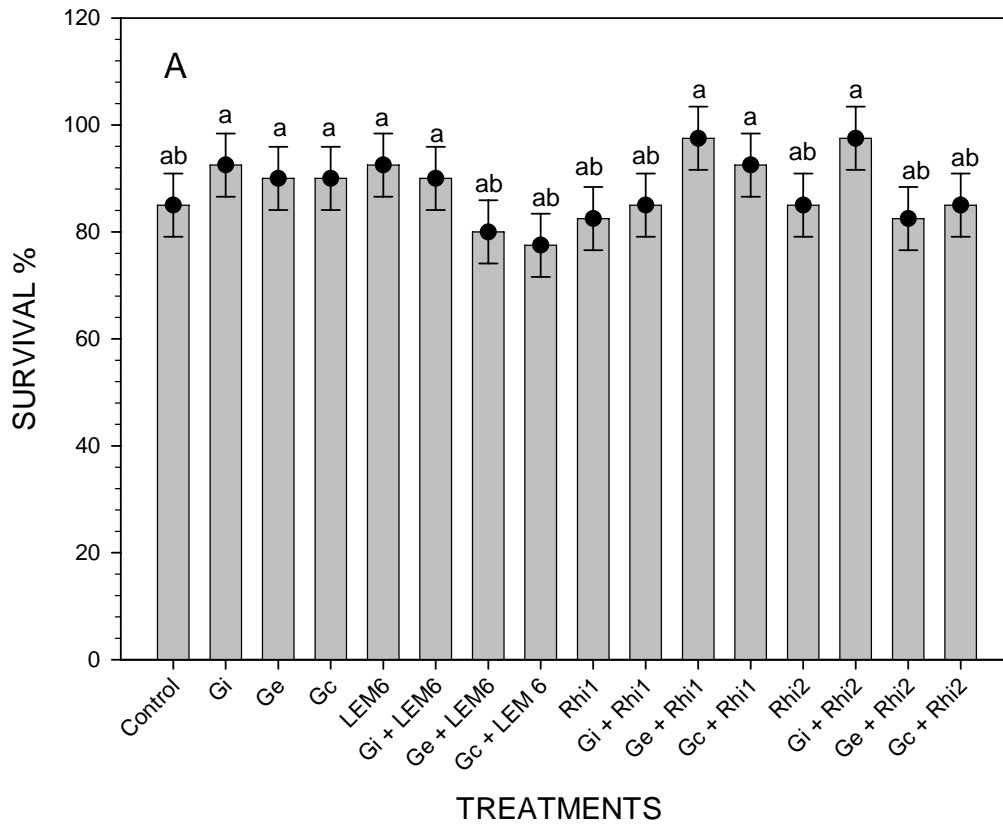


Figure 4

