



A co-inoculação com fungos micorrízico arbusculares e bactérias fixadoras de nitrogênio é altamente benéfica para a *Mimosa scabrella*⁽¹⁾.

Silmar Primieri⁽²⁾; Julio Cesar Pires Santos⁽³⁾; Pedro M. Antunes⁽⁴⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da Algoma University, ON, Canadá.

⁽²⁾ Professor do Instituto Federal de Santa Catarina – IFSC, câmpus Lages/SC. E-mail: silmar.primieri@ifsc.edu.br ⁽³⁾ Professor da Universidade Estadual de Santa Catarina – UDESC/Lages ⁽⁴⁾ Professor na Algoma University/ON/Canadá.

RESUMO: A bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) é uma espécie nativa de leguminosa arbórea muito utilizada por agricultores familiares no estado de Santa Catarina. Além da capacidade de associação com bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN), ela pode estabelecer simbiose com fungos micorrízicos arbusculares (FMA). O objetivo do trabalho foi avaliar o desenvolvimento de mudas de *Mimosa scabrella* sob inoculação com FMA e BFN. Um experimento, em câmara de crescimento, foi conduzido em delineamento completamente casualizado, composto por 4 tratamentos: BFN (*Burkholderia sp.*), FMA (*Glomus intraradices*) e combinação de BFN e FMA, além do controle sem microrganismos. As plantas foram avaliadas após noventa dias em sua massa seca da parte aérea (MSPA), de raiz (MSR), acúmulo de nitrogênio (ANPA), número de nódulos (NN), massa seca (MSN), comprimento, área superficial e volume de raiz, além da colonização micorrízica. Os resultados demonstraram dependência de inoculação de FMA e BFN no desenvolvimento de mudas de *Mimosa scabrella* sob condições limitantes de fósforo. Além da MSPA e MSR, a inoculação com FMA e BFN influenciou positivamente a nodulação, o acúmulo de nitrogênio e as variáveis radiculares, relativamente aos tratamentos com cada um desses microrganismos.

Termos de indexação: simbiose, leguminosa, sinergismo.

INTRODUÇÃO

Ao longo da história de ocupação do estado de Santa Catarina (SC), a Floresta Ombrófila Mista ou Mata de Araucária, principal bioma da serra catarinense, foi alvo de intensa exploração madeireira levando a uma mudança significativa no uso do solo; atualmente menos de 1% do total dessa floresta é remanescente. A bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth., Fabaceae) é uma espécie componente dessa formação florestal; de porte arbóreo, ocorre em áreas de floresta secundária ou em regeneração (Carvalho, 2002).

Essa árvore é um dos recursos florestais nativos do Sul do Brasil mais utilizado por

agricultores familiares de Santa Catarina com múltiplas utilidades: na produção apícola de mel e melato, como espécie paisagística, na produção de celulose, na indústria madeireira, como palanques e escoras, na recuperação de áreas degradadas e como fonte de energia (Embrapa, 1988; Müller, 2011). Além disso, as folhas da bracatinga podem ter mais de 19% de proteína bruta e é consumida pelos ruminantes no período hibernar quando há restrição das pastagens (Freitas et al., 1994).

A bracatinga, assim como outras espécies leguminosas, forma, nas raízes, associações simbióticas com bactérias diazotróficas, em estruturas denominadas nódulos (de Faria et al., 1984; Gaiad & Carpanezzi, 1984; Primieri et al., 2013). Em troca de nutrientes e energia, as bactérias realizam a FBN e produzem NH₃ que, uma vez transferido aos tecidos vegetais, pode ser metabolizado em aminoácidos e proteínas. No trabalho de Primieri (2013), isolados bacterianos foram capazes de fixar o mesmo montante de nitrogênio que o controle fertilizado, demonstrando a importância desse processo para a espécie.

A eficiência da FBN pode ter relação direta com a presença de fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Andrade et al. (2000), relatou pela primeira vez a ocorrência de estruturas típicas, como arbúsculos, hifas intracelulares e vesículas nas raízes em *M. scabrella*. Um dos efeitos mais pronunciados de FMA é o aumento na absorção de nutrientes e água pelas hifas do fungo, que são disponibilizados ao hospedeiro vegetal em troca de fotossintatos (Smith & Read, 2008), principalmente aqueles que apresentam menor mobilidade no solo, como o fósforo, ou incrementar a absorção de água em condições de estresse hídrico (Moreira et al., 2010).

A co-inoculação de FMA e BFN pode desencadear efeitos sinérgicos entre eles e a planta, amplificando suas funções positivas (Antunes et al., 2006).

Nossa hipótese é que a simbiose tripartite, planta, FMA e BFN são fundamentais para o crescimento de *Mimosa scabrella*, principalmente em solos pobres em fósforo, que é característica de solos onde essa espécie se desenvolve naturalmente.



O objetivo do trabalho foi avaliar o crescimento de mudas de *Mimosa scabrella* sob inoculação com FMA, BFN ou a combinação desses dois grupos.

MATERIAL E MÉTODOS

Organismos estudados

As sementes de bracinga foram coletadas de única matriz localizada no município de Urupema/SC, sob as coordenadas geográficas 27°57'41.75"S e 49°50'40.90"O e armazenadas na geladeira. A quebra de dormência das sementes foi realizada por imersão em água a 80°C durante cinco minutos, deixando-as em repouso durante 18 horas. Em seguida, as sementes foram pré-germinadas em folhas de papel absorvente Gear Box®, umedecidas com água destilada esterilizada, em câmara do tipo B.O.D. (Biological Oxygen Demand) a 25°C, até a protrusão da radícula alcançar de 1 a 2 cm de comprimento.

A bactéria fixadora de nitrogênio utilizada foi previamente isolada e testada quanto a FBN (Primieri, 2013), pertencente ao gênero *Burkholderia*. A produção do inóculo foi realizada em frascos de Erlenmeyer com 30mL de meio levedura manitol (LM), incubados por 36 horas a 28°C, sob agitação constante (Vincent, 1975).

O inóculo de FMA consistiu de MYKE PRO (Premier Tech Biotechnologies, Rivière du Loup, Québec, Canadá) que é composto de 500 propágulos viáveis por grama de *Glomus intraradices*. O inóculo foi examinado para confirmar a aparência saudável dos esporos, que eram abundantes, e que não havia contaminação com esporos de outras espécies.

Instalação do experimento

O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado, consistindo do fator inoculação com quatro tratamentos: controle não inoculado, FMA, BFN e FMA + BFN (*Burkholderia sp.*).

Potes com 2,8L de capacidade foram utilizados, preenchidos com substrato formado por solo, areia e vermiculita (1:1:1) previamente esterilizados separadamente em autoclave (121°C por 30 minutos horas). O fornecimento de nutrientes foi realizado semanalmente, 100 mL de solução nutritiva de Hoagland modificada sem nitrogênio e mantendo a concentração de P sob 20 mg kg⁻¹, considerado baixo para as plantas, mas ainda acima da concentração encontrada em solos onde esta espécie ocorre naturalmente (Mazuchowski et al,

2014).

Os tratamentos com FMA foram inoculados com 10 g do inóculo por vaso, colocando uma camada fina, 1 cm abaixo da superfície do substrato, quando as plântulas foram transferidas. Potes atribuídos a BFN foram inoculados com 1 ml de meio líquido, levedura Manitol (YM), incubadas previamente a 28°C num agitador, contendo cerca de 10⁹ UFC ml⁻¹ (Hungria & Araújo, 1994). A inoculação foi realizada sete dias após o transplante das mudas para permitir o seu estabelecimento no substrato.

Os potes foram então distribuídos em câmara de crescimento, localizada na Algoma University, Sault Ste Marie, Canadá, com 18 horas de luz diária, temperatura constante de 25°C e umidade relativa controlada a 55%.

Coleta de dados e parâmetros avaliados

As plantas foram colhidas após 90 dias de crescimento. O substrato foi removido do sistema radicular das plantas e seco à temperatura ambiente em sacos de plásticos abertos. Caules e raízes foram separados na linha do solo. As raízes foram lavadas e os nódulos presentes nas raízes foram contados para avaliar a inoculação. Em seguida, os sistemas radiculares foram armazenados em etanol a 50%. A parte aérea e os nódulos foram secos durante cinco dias, numa estufa com ar forçado, a uma massa constante a 60°C e posteriormente pesados.

Todos os sistemas radiculares foram digitalizados usando o sistema WinRhizo Pro (2009) software de digitalização (Regent Instruments Canada Inc.) com o scanner Epson Expression 10000 XL. Para o processo, as raízes foram removidas do etanol e imersas em uma bandeja transparente com água. Os dados foram coletados para cada réplica nas seguintes variáveis: comprimento total da raiz, área superficial radicular, volume total radicular e diâmetro médio.

Posteriormente, as raízes foram cortadas em segmentos de um centímetro e uma sub-amostra representativa de cada repetição foi colocada em cassetes (HistoPrep OmniS-ette; Fisher Scientific Healthcare, Pittsburgh, PA, USA). As amostras foram limpas em 10% de KOH durante 1 h a 80°C, acidificadas com HCl a 1% durante 20 min, e depois coradas com Azul de Tripiano (0,05%). Raízes coradas foram colocadas em glicerol durante a noite para remover a mancha residual e em seguida, colocadas em lâminas de microscópio para a análise de características dos fungos (isto é, hifas, vesículas e arbúsculos). Percentual de colonização

por FMA foi medida pelo método de intersecção das linhas de grade em 200x ampliação (McGonigle et al., 1990).

Análise estatística

Os dados foram analisados usando ANOVA one-way, seguido pelo teste post-hoc de Tukey ($P \leq 0,05\%$). Quando necessário, os dados foram submetidos à transformação Box-Cox para estabilizar a variância residual (Sakia, 1992). Os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando software STATISTICA (Statsoft, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que o crescimento de mudas de *Mimosa scabrella* foi significativamente melhor na presença de BFN + FMA, do que de cada um desses grupos de microrganismos em separado (**Tabela 1**) e (**Figura 1**). A interação entre os dois microrganismos aumentou, em mais de duas vezes, a massa seca da parte aérea (MSPA) e o acúmulo de nitrogênio na planta (ANPA). A massa seca da raiz (MSR) também foi afetada positivamente pelo tratamento com os dois microrganismos.

A presença de FMA teve influencia significativa no número de nódulos (NN) e em sua massa seca (MSN), demonstrando que a micorriza é importante para o estabelecimento da bactéria, melhorando seu crescimento.

Tabela 1 – Massa seca da parte aérea (MSPA), acúmulo de nitrogênio total (ANPA), massa seca de raiz (MSR), número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSN) em mudas de *Mimosa scabrella*.

Tratamento	MSPA mg/planta	ANPA mg/planta	MSR mg/planta	NN	MSN mg
Controle	509 b	9,2 b	15 b	-	-
BFN	742 b	14,0 b	17 ab	72 b	9,5 b
FMA	866 b	14,5 b	29 ab	-	-
BFN+FMA	1870 a	52,0 a	44 a	139 a	50,1 a

Médias seguidas de diferentes letras na coluna indicam diferenças entresi (ANOVA) a $P \leq 0,05$.

Em relação às variáveis radiculares, a interação BFN e FMA foi significativa para os dados (**Tabela 2**), aumentando os valores em relação ao comprimento da raiz (CR), área superficial radicular (ASR) e volume total radicular (VTR)

Tabela 2 – Comprimento da raiz (CR), área superficial radicular (ASR) e volume total radicular (VTR), em mudas de *Mimosa scabrella*.

Tratamento	CR m	ASR cm ²	VTR cm ³
Controle	1,1 b	150 ab	1,5 ab
FMA	1,0 b	127 b	1,3 b
BFN	1,9 ab	300 ab	3,2 ab
BFN+FMA	2,8 a	346 a	3,4 a

Médias seguidas de diferentes letras na coluna indicam diferenças entre si (ANOVA) a $P \leq 0,05$.

A colonização micorrízica (CM) também melhorou com a interação entre os microrganismos, de 40% de CM quando inoculado apenas com o FMA, este parâmetro chegou a 83% com a presença da BFN.

Como resultado de seu papel no fornecimento de nutrientes, que são frequentemente limitantes para a produtividade da planta, FMA e BFN podem ter efeitos sinérgicos sobre plantas hospedeiras através da redução da limitação por fósforo e nitrogênio, entre outros mecanismos (Antunes & Goss, 2005).

Estes resultados são consistentes com dados reportados para outras espécies (Antunes et al. 2006; Wang et al., 2011; Bauer et al., 2012), mostrando pela primeira vez que a bracinga pode responder muito significativamente a FMA e BFN.



Figura 1 – *Mimosa scabrella* cultivada em câmara de crescimento inoculada com BFN (meio), com BFN + FMA (direita) e o controle sem microrganismo (esquerda).

CONCLUSÕES

Além da massa seca, a inoculação conjunta com FMA e BFN influenciou positivamente a nodulação, o acúmulo de nitrogênio e as variáveis radiculares. Estes resultados demonstraram



dependência de inoculação de FMA e BFN no desenvolvimento de mudas de *Mimosa scabrella* sob condições limitantes de fósforo e abrem assim boas perspectivas para o estudo da diversidade funcional desses microrganismos com vista a uma maior produtividade e utilização desta espécie arbórea como recurso natural.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à equipe do laboratório Plant and Soil Ecology, Algoma University/Canadá pelo auxílio no experimento e financiamento do projeto. Também agradecemos à UDESC/CAV/Lages e IFSC pelo apoio e a CAPES pela bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A. C. S.; QUEIROZ, M. H.; HERMES, R. A. L. et al. Mycorrhizal status of some plants of the Araucaria forest and the Atlantic rainforest in Santa Catarina, Brazil. *Mycorrhiza*, 10: 131-136, 2000.
- ANTUNES, P. M. & GOSS, M. J. Communication in the tripartite symbiosis formed by arbuscular mycorrhizal fungi, rhizobia and legume plants: A Review. *American Society of Agronomy*: 199-222, 2005.
- ANTUNES, P. M., DE VARENNES, A., ZHANG, T., & GOSS, M. J.. The tripartite symbiosis formed by indigenous arbuscular mycorrhizal fungi, Bradyrhizobium japonicum and soya bean under field conditions. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 192(5): 373-378, 2006.
- BAUER, J. T.; KLECZEWSKI, N. M.; BEVER, J. D.; CLAY, K. & REYNOLDS, H. L. Nitrogen-Wxing bacteria, arbuscular mycorrhizal fungi, and the productivity and structure of prairie grassland communities. *Oecologia*, 170: 1089-1098, 2012.
- CARVALHO, P. E. R. Bracatinga. Colombo: Embrapa Florestas. 2002. 12 p. (Embrapa Florestas. Circular Técnica, 59). Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/306462/1/CT0059.pdf>>. Acesso em 22 jun. 2014.
- DE FARIA, S.M.; MOREIRA, V.C.G.; FRANCO, A.A. Seleção de estirpes de *Rhizobium* para espécies leguminosas florestais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 19: 175-179, 1984.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Florestas. Manual técnico da bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.). Curitiba: Embrapa CNPF, 1988. 70p. (Embrapa-CNPF. Documentos, 20).
- FREITAS, E. A. G.; DUFLOTH, J. H.; GREINER, L. C. Tabela de composição químico-bromatológica e energética dos alimentos para animais ruminantes em Santa Catarina. Florianópolis: Epagri, 1994. 33 p. (Epagri. Documentos, 155).
- GAIAD, S.; CARPANEZZI, A.A. Ocorrência de *Rhizobium* em leguminosas de interesse silvicultural para a região sul. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.19, n.13, p.155-158, 1984.
- HUNGRIA, M. & ARAUJO, R. S. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. EMBRAPA. SPI. Brasília. 1994. 542p.
- MAZUCHOWSKI, J. Z.; RECH, T. D. & TORESAN, L. (Org.). Bracatinga: Cultivo, manejo e usos da espécie. Epagri, 2014. 364p.
- MCGONIGLE, T. P.; MILLER, M. H.; EVANS, D. G. FAIRCHILD, G. L. & SWAN, J. A. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New phytologist*. 115: 495-501, 1990.
- MOREIRA, F.M.S.; FARIA, S.M.; BALIEIRO, F.C. et al. Bactérias fixadoras de N₂ e fungos micorrízicos arbusculares em espécies florestais: avanços e aplicações biotecnológicas. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; OLIVEIRA, J.P. et al. Biotecnologia aplicada à agricultura: Textos de apoio e protocolos experimentais. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Recife, PE: IPA, 2010.
- MÜLLER, J.J.V. Levantamento socioambiental do inventário florestal. Florianópolis: Epagri, 2011.
- PRIMIERY, S.; BRANCO, B.S.; DALLA COSTA, M. et al. Diversidade morfológica de rizobactérias em nódulos de bracatinga (*Mimosa scabrella*) no estado de Santa Catarina. In: seminário de pesquisa, extensão e inovação do ifsc, 2013, Lages, SC. Anais... Lages, 2013.
- SAKIA, R. M. The Box-Cox transformation technique: a review. *The Statistician*, 41: 169-178, 1992.
- SMITH, S.E.; READ, D. J. Mycorrhizal symbiosis. 3.ed. London: Academic Press, 2008. 815p.
- StatSoft, Inc. (2002). *STATISTICA* for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK, 74104-4442, (918) 749-1119, fax: (918) 749-2217, e-mail: info@statsoft.com, Web: <http://www.statsoft.com>.
- Vincent J. A Manual for the practical study of root-nodule bacteria. *Oxford: Blackwell Scientific* 21-23, 1970.
- WANG, X.; PAN, Q.; CHEN, F.; YAN, X. & LIAO, H. Effects of co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on soybean growth as related to root architecture and availability of N and P. *Mycorrhiza*, 21: 173-181, 2011.

**XXXV Congresso
Brasileiro de
Ciência do Solo**

CENTRO DE CONVENÇÕES - NATAL / RN



**O SOLO E SUAS
MÚLTIPLAS FUNÇÕES**
02 a 07 DE AGOSTO DE 2015