

MARSÍLVIO GONÇALVES PEREIRA

**INTERAÇÕES ENTRE FUNGOS MICORRÍZICOS  
ARBUSCULARES (FMA), RIZÓBIO E ACTINOMICETOS NA  
RIZOSFERA DE SOJA**

RECIFE  
PERNAMBUCO - BRASIL  
JULHO-2011

MARSÍLVIO GONÇALVES PEREIRA

**INTERAÇÕES ENTRE FUNGOS MICORRÍZICOS  
ARBUSCULARES (FMA), RIZÓBIO E ACTINOMICETOS NA  
RIZOSFERA DE SOJA**

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

Orientadora:

Dra. Carolina Etiene de Rosália e Silva Santos

Co-orientação:

Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas

Dr. Newton Pereira Stamford

RECIFE  
PERNAMBUCO - BRASIL  
JULHO-2011

Ficha catalográfica

P436i Pereira, Marsílvio Gonçalves

Interações entre fungos micorrízicos arbusculares (FMA),  
rizóbio e actinomicetos na rizosfera de soja / Marsílvio Gonçalves  
Pereira – Recife, 2011.

115 p. : il.

Orientadora: Carolina Etiene de Rosália e Silva Santos  
Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade  
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia,  
Recife, 2011.

Inclui referências e apêndice.

1. Micorriza arbuscular 2. *Bradyrhizobium* 3. *Glycine max*  
4. *Streptomyces* 5. Microbiologia do Solo 6. Ecologia Microbiana  
7. Interações microbianas 8. Rizosfera 9. Soja 10. Rizóbio

I. Santos, Carolina Etiene de Rosália e Silva, orientadora

II. Título

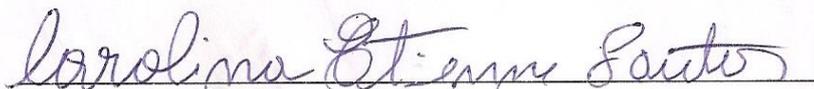
CDD 631.4

MARSÍLVIO GONÇALVES PEREIRA

**INTERAÇÕES ENTRE FUNGOS MICORRÍZICOS  
ARBUSCULARES (FMA), ACTINOMICETOS E RIZÓBIO NA  
RIZOSFERA DE SOJA**

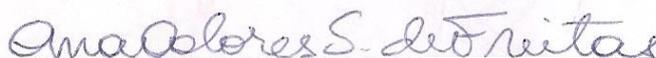
Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em 28 de julho de 2011.

**ORIENTADORA:**

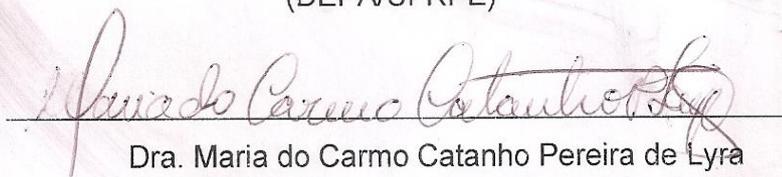


Dra. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos  
(DEPA/UFRPE)

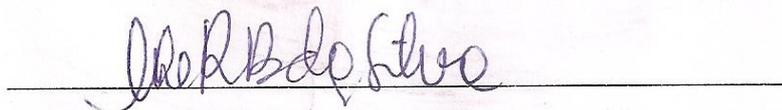
**EXAMINADORES:**



Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas  
(DEPA/UFRPE)



Dra. Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra  
(Instituto Agrônômico de Pernambuco – IPA)



Dra. Maria Luíza Ribeiro Bastos da Silva  
(Instituto Agrônômico de Pernambuco – IPA)

Homenagem *In memoriam*

*Ao Pesquisador Dr. João Carlos Pereira pelo incentivo a  
pesquisa com actinomicetos e apoio recebido no Laboratório  
de Ecologia Microbiana – CNPAB/EMBRAPA.*

*Aos amigos Andrey, Jorge e José Ailton, pelas palavras e  
gestos amigos e pelo valor da amizade sincera.*

*Serei eternamente grato a todos vocês!!*

Aos meus avós maternos Alice Silva Nunes e José Gonçalves Nunes (*In memoriam*), que os perdi nessa trajetória acadêmica, pelo exemplo de seres humanos, trabalho, dedicação e amor aos filhos e netos e aos meus pais queridos Severina Gonçalves Pereira e Manoel Antônio Pereira (sábio agricultor), pela dedicação e amor aos filhos e pelo incentivo e apoio em toda a minha vida,

Dedico

## Agradecimentos

Aos meus pais, Severina Gonçalves Pereira e Manoel Antônio Pereira, pela dedicação aos filhos e apoio durante toda minha vida.

Aos meus familiares, pelo apoio recebido. A Thiago Pereira Rique (meu sobrinho) pela revisão do Abstract.

Aos novos irmãos e amigos Gewerlys Stallony Diego Costa da Rocha (Gew) e Alessandro Tomaz Barboza, pelo incentivo, apoio na tabulação, análises dos dados e em vários momentos do trabalho e por todos os momentos de uma amizade verdadeira.

As amigas Vera Lúcia Araújo de Lucena e Zoraida Maria Davino de Medeiros, e ao amigo Maylton Souza pelo apoio e estímulo recebido.

Aos irmãos e amigos pernambucanos José Antônio Alves da Silva (Zé Antônio) e Amaro Paz de Oliveira Filho (Marinho), pelo apoio, amizade e incentivo nos momentos difíceis.

À “Tia Penha”, “Tio Zé” e a Aline pelo apoio e carinho da acolhida no Rio de Janeiro.

À minha orientadora e amiga Profa. Dra. Carolina Etiene de Rosália e Silva Santos, pela dedicação, amizade, orientação e por ter acreditado na viabilidade da realização desse trabalho.

Aos co-orientadores, Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas e o Prof. Dr. Newton Pereira Stamford, por ter apoiado e orientado nos momentos oportunos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da UFRPE, em particular ao Prof. Dr. Clístenes Williams Araújo do Nascimento (ex-coordenador) e ao Prof. Dr. Valdomiro Severino de Souza Júnior (coordenador atual), pela oportunidade oferecida para a realização deste curso.

As pesquisadoras, Dra. Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra e Dra. Maria Luíza Ribeiro Bastos da Silva, do (Instituto Agrônômico de Pernambuco – IPA), pelas observações, sugestões e contribuições ao trabalho.

A Pesquisadora Dra. Maria Cristina Prata Neves pelo apoio e pela orientação no trabalho durante o período de realização no Laboratório de Ecologia Microbiana do CNPAB/EMBRAPA e ter acreditado na viabilidade do fechamento deste trabalho na UFRPE.

A Pesquisadora Dra. Eliane Maria Ribeiro da Silva, pelas orientações, incentivo e dedicação à pesquisa com Micorrizas Arbusculares e também pela sua amizade.

Ao CNPAB/EMBRAPA, pela oportunidade de realizar este trabalho e pelo apoio institucional. O suporte técnico e apoio dos excelentes profissionais durante a montagem e condução dos experimentos e, também, pelo companheirismo, foram indispensáveis para a realização deste trabalho.

Aos bibliotecários do CNPAB/EMBRAPA e da Biblioteca da UFRPE, pelo apoio recebido.

Ao Prof. Dr. Joab de Oliveira Lima do Departamento de Estatística da UFPB pelo apoio, pelas análises estatísticas e pelas sugestões no trabalho.

Ao amigo Dr. Carlos Alberto Tuão Gava pelo apoio indispensável na realização desse trabalho na época em que estive no CNPAB/EMBRAPA e na Pós-Graduação em Ciência do Solo da UFRRJ.

À Pesquisadora Dra. Norma Rumjanek do CNPAB/EMBRAPA pelo apoio e incentivo ao trabalho no Laboratório de Ecologia Microbiana – CNPAB/EMBRAPA.

Aos amigos e amigas do CNPAB/EMBRAPA pela convivência agradável, amizade e pelos momentos maravilhosos que compartilhamos juntos.

Aos amigos e amigas da Pós-Graduação em Ciência do Solo da UFRRJ e do Alojamento da EMBRAPA, em especial a Lindete, Claudinha, Bete (Elizabeth), Fernanda, Anselmo, Geraldo, Sandra, José, Edwin, Fabão, Fabinho, David, Rosa Mattos, Jean, Gustavo Xavier, Lincoln Zotarelli, Gustavo Duda, Zé Roberto, Ricardo, Valéria, Conceição (Ceíça), Polidoro, Carlos Alberto, Adagilza, André, Fernanda, Luizão, Lúcia, a D. Luíza (pela comida deliciosa que preparava com tanto carinho) e tanta gente amiga... Valeu por tudo!

Ao técnico do Laboratório de Micorrizas do CNPAB/EMBRAPA, Itamar Garcia Ignácio por toda sua ajuda, dedicação, disposição e amizade.

Aos professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial a Maria do Socorro Santana (Socorro) e o seu Josué pela compreensão e apoio em todas as etapas dessa trajetória.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo da UFRPE, pelo apoio, incentivo e convivência, em especial, a Artenisa, Edivan Uchôa, Daniele (Dany), Fernando, Rosemberg, Sebastião, Raiane, Leidvan, Airon, Cibelle, Jean, Wagner, Emmanuella (Manú), Renato Lemos, Andresa, Vanessa, Marilúcia, Rosângela, Monalisa, Luciana Remígio, Karla, Patrícia, Rayssa, Adelazil, Givanildo, Danúbia, Vinícius, André e tantos outros.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho e pelos bons momentos.

Muito Obrigado!

*“Tenha fortaleza de ânimo, para resistir a todos os embates e tempestades do caminho. Não se iluda: mesmo a estrada do bem está cheia de tropeços e dificuldades... Continue, porém! Não dê ouvidos às pedras colocadas pela inveja, pelo ciúme, pela intriga... Marche de cabeça erguida, confiantemente, e vencerá todos os obstáculos da caminhada. E, se for ferido, lembre-se de que as cicatrizes serão luzes que marcarão a sua vitória.”*

Por Carlos Torres Pastorino

## BIOGRAFIA

MARSÍLVIO GONÇALVES PEREIRA, nascido em 27 de maio de 1965, filho de Manoel Antônio Pereira e Severina Gonçalves Pereira, em Santa Rita, estado da Paraíba. Ingressou na Universidade Federal da Paraíba em 1985, no Curso de Ciências Biológicas, concluindo o Bacharelado e a Licenciatura em 1989 e 1990, respectivamente. Foi bolsista de Iniciação Científica do CNPq, no Laboratório de Malacologia, do Departamento de Sistemática e Ecologia-CCEN-UFPB e no Laboratório de Entomologia Médica do NUMETROP (Núcleo de Medicina Tropical) – CCS-UFPB. Foi estagiário do Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia (LABIME) do Núcleo de Biotecnologia do Laboratório Tecnológico Farmacêutico (LTF)-UFPB e do Laboratório de Micorrizas do Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB) – EMBRAPA. No período de 1991 a 1992 foi Professor da Faculdade de Farmácia e Biologia da Universidade Estadual da Paraíba, em Campina Grande e desde dezembro de 1992 é Professor da Universidade Federal da Paraíba, Campus I, em João Pessoa-PB. Em Janeiro de 1995 concluiu a Especialização em Ciências Ambientais na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, com Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso sobre Micorrizas Arbusculares em Acerola, sob orientação da Dra. Eliane Maria Ribeiro da Silva, desenvolvido no Laboratório de Micorrizas e no Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA) – Fazendinha, no Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia/EMBRAPA, Seropédica-RJ. Em março de 1996, na UFRRJ, iniciou seu Mestrado em Ciência do Solo, trabalhando seu projeto de Pesquisa no CNPAB – EMBRAPA, no Laboratório de Ecologia Microbiana, sendo bolsista da CAPES e tendo como orientadora a Dra. Maria Cristina Prata Neves e como co-orientador do Dr. João Carlos Pereira (*In memoriam*), tendo que interromper seus estudos em função de um grave acidente e de seu retorno ao trabalho na UFPB. Em março de 2009 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia- Ciência do Solo, no Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, UFRPE.

PEREIRA, MARSÍLVIO GONÇALVES. MSc. Pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, julho de 2011. Interações entre fungos micorrízicos arbusculares (FMA), rizóbio e actinomicetos na rizosfera de soja. Orientadora: Dra. Carolina Etiene de Rosália e Silva Santos.

## RESUMO

Os estudos sobre as interações biológicas envolvendo fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e outros micro-organismos do solo e sua influência no desenvolvimento e produção de espécies vegetais agrosilvipastoris tem incentivado as pesquisas numa tentativa de melhor compreender a biologia da rizosfera e suas implicações no desenvolvimento da agricultura moderna de qualidade e ecologicamente correta. Os actinomicetos do solo interagem sob diferentes formas com os FMA e rizóbios na rizosfera das plantas, merecendo destaque as interações antagonistas e parasíticas, pois esses micro-organismos são capazes de produzirem antibióticos e muitos têm atividade quitinolítica, porém existem também espécies benéficas que podem estimular o desenvolvimento de outros micro-organismos rizosféricos benéficos para as plantas, como é o caso dos FMA e rizóbio. Isolados de actinomicetos e de FMA foram testados em sistemas de coinoculação *in vivo* em plantas de soja inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* spp. em casa de vegetação, em três experimentos, para se avaliar as interações biológicas e como elas influenciam o desenvolvimento da planta hospedeira. Os parâmetros avaliados foram: biomassa de raiz seca e de parte aérea seca; número e biomassa de nódulos secos, colonização rizosférica pelos isolados de actinomicetos através de diluições seriadas e teores nutricionais de P, K, Ca e Mg na parte aérea e raiz de plantas de soja. Todos os isolados de actinomicetos inoculados foram recuperados da rizosfera de soja numa densidade final de  $10^4$  UFC/g de raiz sem nenhuma diferença significativa entre os tratamentos, no experimento I. No experimento II houve a influência dos isolados de FMA na densidade de actinomicetos na rizosfera da soja. No experimento I, os números de nódulos indicaram existir tanto uma influência antibiótica quanto uma influência probiótica dos isolados de actinomicetos sobre as estirpes de rizóbio

estudados, visto que, o ACT-78 promoveu uma maior nodulação quando coinoculado com a estirpe BR33 reduzindo significativamente a nodulação da estirpe BR29, enquanto que o ACT-370 proporcionou uma maior nodulação junto a BR29 e diminuiu a nodulação da BR33. No período estudado, não houve resposta significativa no peso de raiz seca e de parte aérea seca das plantas. No experimento II, a inoculação dos isolados de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), influenciou de modo expressivo variáveis de crescimento, de nodulação, nutricionais e densidade de actinomicetos na rizosfera de soja que apresentaram valores maiores do que as plantas sem o inoculo fúngico. Constatou-se também que o fator FMA influenciou decisivamente os outros fatores com implicações para o crescimento e dinâmica nutricional de plantas de soja cv. Seridó. Os resultados revelam a existência de interações sinérgicas ou antagônicas entre os micro-organismos estudados.

Palavras-chave: Micorriza arbuscular; *Bradyrhizobium*; *Glycine max*; *Streptomyces*.

PEREIRA, MARSÍLVIO GONÇALVES. MSc. Pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, julho de 2011. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), actinomycetes and rhizobium in the rhizosphere of soybean. Orientadora: Dra. Carolina Etiene de Rosália e Silva Santos.

## ABSTRACT

Studies on the biological interactions involving arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and other soil microorganisms and their influence on the development and production of agrosilvipastoris plant species has encouraged research with the aim of trying to better understand the biology of the rhizosphere and its implications on the development of modern agriculture of quality and ecologically correct. The soil actinomycetes interact in different ways with the AMF and rhizobia in the rhizosphere of plants, with emphasis on parasitic and antagonistic interactions, because these microorganisms are capable of producing antibiotics and many have chitinolytic activity, but there are also beneficial species that can stimulate the development of other rhizospheric microorganisms beneficial to plants, as it is the case of AMF and rhizobia. Actinomycete and AMF were tested in *in vivo* coinoculation systems in soybean plants inoculated with strains of Bradyrhizobium spp. in a greenhouse in three experiments to evaluate the biological interactions and how they influence the development of the host plant. The parameters evaluated were biomass of dried root and shoot dry; number and biomass of dry nodules, rhizospheric colonization by actinomycete through serial dilutions and nutritional contents of P, K, Ca and Mg in shoots and roots of soybean plants. All actinomycete inoculated were recovered from the rhizosphere of soybeans in a final density of  $10^4$  CFU / g of root with no significant difference among treatments in experiment I. In experiment II there was the influence of AMF on the density of actinomycetes in the rhizosphere of soybeans. In experiment I, the numbers of nodules indicated that there is an influence both antibiotic and probiotic of actinomycete on the strains of rhizobia studied, since the ACT-78 promoted a greater nodulation when coinoculated with the strain BR33 reducing significantly the nodulation of the strain BR29, whereas the ACT-370 provided a greater

nodulation with the BR29 and decreased the nodulation of the BR33. In the period studied, there was no significant response in the weight of dried root and shoot dry of plants. In the second experiment, the inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) influenced expressively variables of growth, nodulation, nutritional and density of actinomycetes in the rhizosphere of soybean, which head greater values than plants without fungal inoculum. It was also verified that the factor AMF influenced decisively the other factors with implications for growth and nutritional dynamics of soybean plants cv. Seridó. The results reveal the existence of interactions synergistic or antagonistic between micro-organisms studied.

Keywords: Arbuscular Mycorrhizae; *Bradyrhizobium*; *Glycine max*; *Streptomyces*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

<b>Figura 1.</b> Número de nódulos de soja em presença de dois isolados de actinomicetos ( <i>Streptomyces</i> spp.) e duas estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp. ...	48
<b>Figura 2.</b> Comparações múltiplas das médias da variável BPAS para o fator 1 do experimento 2.....	55
<b>Figura 3.</b> Comparações múltiplas das médias da variável BPAS para a interação entre os fatores 1 e 2 do experimento 2.....	55
<b>Figura 4.</b> Comparações múltiplas das médias da variável BRS para o fator 1 do experimento 2. ....	56
<b>Figura 5.</b> Comparações múltiplas das médias da variável relação BPAS/BRS para o fator 1 do experimento 2.....	57
<b>Figura 6.</b> Comparações múltiplas das médias da variável relação BPAS/BRS para a interação entre os fatores 1 e 2 do experimento 2. ....	57
<b>Figura 7.</b> Comparações múltiplas das médias da variável BNS os fatores 1, 2 e 3 do experimento 2.....	60
<b>Figura 8.</b> Comparações múltiplas das médias da variável BNS para a interação entre os fatores 1 e 3 do experimento 2. ....	61
<b>Figura 9.</b> Comparações múltiplas das médias da variável PPAS para os fatores 1, 2 e 3 do experimento 2.....	63
<b>Figura 10.</b> Comparações múltiplas das médias da variável PPAS para a interação entre os fatores 2 e 3 do experimento 2.....	64
<b>Figura 11.</b> Comparações múltiplas das médias das variáveis PRAIZ (a) e PTOTAL (b) para o fator 1 do experimento 2.....	64
<b>Figura 12.</b> Comparações múltiplas das médias da variável KPAS para os fatores 1, 2 e 3 do experimento 2.....	66
<b>Figura 13.</b> Comparações múltiplas das médias da variável KPAS para a interação entre os fatores 1 e 2 do experimento 2. ....	67
<b>Figura 14.</b> Comparações múltiplas das médias da variável KPAS para a interação entre os fatores 1 e 3 do experimento 2.....	67
<b>Figura 15.</b> Comparações múltiplas das médias da variável KPAS para a interação entre os fatores 2 e 3 do experimento 2. ....	68

<b>Figura 16.</b> Comparações múltiplas das médias da variável KRAIZ para os fatores 1 e 2 do experimento 2.....	69
<b>Figura 17.</b> Comparações múltiplas das médias da variável KRAIZ para a interação entre os fatores 1 e 2 do experimento 2.....	70
<b>Figura 18.</b> Comparações múltiplas das médias da variável KTOTAL para os fatores 1, 2 e 3 do experimento 2.....	71
<b>Figura 19.</b> Comparações múltiplas das médias da variável KTOTAL para a interação entre os fatores 1 e 2 do experimento 2.....	72
<b>Figura 20.</b> Comparações múltiplas das médias da variável KTOTAL para a interação entre os fatores 2 e 3 do experimento 2.....	72
<b>Figura 21.</b> Comparações múltiplas das médias da variável CaPAS para os fatores 1 e 3 do experimento 2.....	74
<b>Figura 22.</b> Comparações múltiplas das médias da variável CaPAS para a interação entre os fatores 1 e 3 do experimento 2. ....	75
<b>Figura 23.</b> Comparações múltiplas das médias das variáveis CaRAIZ (a) e CaTOTAL (b) para o fator 1 do experimento 2.....	75
<b>Figura 24.</b> Comparações múltiplas das médias da variável MgPAS para os fatores 1 e 3 do experimento 2.....	76
<b>Figura 25.</b> Comparações múltiplas das médias da variável MgPAS para a interação entre os fatores 1 e 3 do experimento 2. ....	77
<b>Figura 26.</b> Comparações múltiplas das médias da variável MgRAIZ para os fatores 1 e 2 do experimento 2.....	78
<b>Figura 27.</b> Comparações múltiplas das médias da variável MgRAIZ para a interação entre os fatores 1 e 2 do experimento 2.....	79
<b>Figura 28.</b> Comparações múltiplas das médias da variável MgTOTAL para os fatores 1 e 2 do experimento 2.....	79
<b>Figura 29.</b> Comparações múltiplas das médias da variável MgTOTAL para a interação entre os fatores 1 e 2 do experimento 2. ....	80
<b>Figura 30.</b> Comparações múltiplas das médias da variável DARS para os fatores 1, 2 e 3 do experimento 2. ....	83
<b>Figura 31.</b> Comparações múltiplas das médias da variável DARS para a interação entre os fatores 1 e 2 do experimento 2. ....	84
<b>Figura 32.</b> Comparações múltiplas das médias da variável DARS para a interação entre os fatores 1 e 3 do experimento 2.....	85

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características químicas e físicas do solo .....	42
<b>Tabela 2.</b> Densidade de actinomicetos da rizosfera de soja (UFC/g de raiz), biomassa de raiz seca (BRS) e biomassa de parte aérea seca (BPAS) de soja cv. Seridó, em vasos Leonard, em resposta à coinoculação com isolados de actinomicetos e de <i>Bradyrhizobium</i> spp. Médias de três repetições.....	47
<b>Tabela 3.</b> Peso unitário de nódulos secos (mg) de soja cv. Seridó, em vasos Leonard, em resposta à coinoculação de isolados de actinomicetos e <i>Bradyrhizobium</i> spp. ....	48
<b>Tabela 4.</b> Comparação por contrastes ortogonais do efeito da coinoculação de isolados de actinomicetos e <i>Bradyrhizobium</i> spp. no peso unitário de nódulos secos (mg) de soja cv. Seridó em vasos Leonard .....	49
<b>Tabela 5.</b> Estatísticas descritivas para as variáveis de entrada do estudo, segundo os tratamentos do Fator 1 do experimento 2 .....	50
<b>Tabela 6.</b> Estatísticas descritivas para as variáveis de entrada do estudo, segundo os tratamentos do Fator 2 do experimento 2.....	52
<b>Tabela 7.</b> Estatísticas descritivas para as variáveis de entrada do estudo, segundo os tratamentos do Fator 3 do experimento 2 .....	53
<b>Tabela 8.</b> Estatísticas descritivas para as variáveis de entrada do estudo, segundo os tratamentos do experimento 3 .....	87

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1. A Rizosfera	22
2.2. O cultivo da soja, o rizóbio ( <i>Bradyrhizobium</i> ) e a fixação biológica de nitrogênio	25
2.3. A microbiota rizosférica e suas interações	26
2.4. Algumas funções de actinomicetos em solos	28
2.5. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), as micorrizas arbusculares (MA) e a micorrizosfera	29
2.6. Interações entre FMA, actinomicetos e rizóbio	32
a. Sinergismo	34
b. Parasitismo, antagonismo e competição	36
2.7. Estímulo a formação de micorrizas arbusculares	38
2.8. Inibição à formação de micorrizas arbusculares	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. Experimento I	41
3.2. Experimento II	42
3.3. Experimento III	45
3.4. Análise estatística dos dados	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5. CONCLUSÕES	88
6. REFERÊNCIAS	90
7. APÊNDICES	107

## 1. INTRODUÇÃO

O estudo das interações entre os micro-organismos do solo é importante para se compreender a dinâmica dos processos que caracterizam as relações entre o solo e as plantas na biosfera. As pesquisas sobre tais interações biológicas e suas influências no desenvolvimento e produção de espécies vegetais agrosilvipastoris têm contribuído na compreensão da biologia da rizosfera e suas implicações no desenvolvimento da agricultura moderna de qualidade e ecologicamente correta.

Entre estas interações as que envolvem rizobactérias e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são de particular interesse em função das interfaces entre o FMA, o solo e a planta, pois os fungos micorrízicos arbusculares se desenvolvem tanto dentro das raízes como fora delas, se expandido através das hifas pela rizosfera.

É no ambiente da rizosfera que ocorrem diversas interações microbianas que são muito significativas, porque podem modificar a relação entre as plantas e os fungos micorrízicos arbusculares (BAREA; AZCÓN; AZCÓN-AGUILAR, 2002; FRACCHIA et al., 2004), assim como afetar outros micro-organismos e as interações entre si e com as plantas. No entanto, essas interações ainda são pouco estudadas, como as que ocorrem na micorrizosfera, entre os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), actinomicetos e rizóbios na rizosfera de soja.

Os micro-organismos responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio (FBN) através da simbiose estabelecida com as plantas leguminosas, são as bactérias conhecidas genericamente como rizóbios. Para Santos et al. (2008), atualmente são conhecidos 12 gêneros e 62 espécies de rizóbios e a tendência é aumentar ainda mais esses números, considerando que a maioria das leguminosas, principalmente nas regiões tropicais do planeta, ainda não foi estudada. Entre estas bactérias estão as do gênero *Bradyrhizobium* que formam nódulos na soja.

O uso de inoculantes com bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Bradyrhizobium* é, atualmente, uma tecnologia indispensável para a cultura da soja no Brasil (ZILLI; CAMPO; HUNGRIA, 2010). A eficiência desses microrganismos tem possibilitado a obtenção de altos rendimentos de grãos da

cultura, sem a necessidade de aplicação de nitrogênio mineral (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003; ZILLI et al., 2006).

O sucesso no processo de nodulação após a inoculação com rizóbio é determinada por vários fatores, tais como fertilidade do solo e competitividade das estirpes inoculantes, que têm de ser capazes de sobreviver e colonizar as raízes das plantas em um ambiente com abundância de microorganismos nativos, produzindo nódulos de fixação (MELCHIORRE et al., 2011). Entre as estirpes de *Bradyrhizobium* selecionadas para a soja, a melhor capacidade de competir por sítios de nodulação no campo tem sido atribuída à espécie *B. elkanii* (BODDEY; HUNGRIA, 1997; NEVES; RUMJANEK, 1997). Porém, quanto ao acúmulo de N, tem sido verificada maior eficiência promovida por *B. japonicum* (NEVES; RUMJANEK, 1997; TEANEY; FUHRMANN, 1992). Infelizmente, tem sido difícil estabelecer estas estirpes superiores em solos recém incorporados ao sistema de produção agrícola ou em solos onde as estirpes resistentes a antibióticos tenham sido introduzidas previamente, ou devido a problemas de competição com os microorganismos nativos e/ou pela inabilidade de sobrevivência nestes solos.

Diversos fatores abióticos e bióticos podem alterar os padrões de competitividade das estirpes de *Bradyrhizobium* spp. Entre os fatores bióticos, Pereira; Neves e Drozdowicz (1999) destacam as populações de actinomicetos na comunidade microbiana de solos tropicais, pelo potencial dos mesmos em produzir antibióticos, pois cerca de 85% dos antibióticos conhecidos são produzidos por esses microorganismos (GOTTLIEB, 1973).

Os antibióticos podem ser produzidos em ecossistemas naturais e agroecossistemas e, no solo, podem apresentar efeitos antagônicos a diversas populações da comunidade microbiana (TURPIN et al., 1992). Entre estes efeitos antagônicos estão aqueles causados a bactérias do grupo rizóbio (PEREIRA; NEVES; DROZDOWICZ, 1999), a bactérias diversas resistentes e sensíveis à metilicina (SATHEEJA; JEBAKUMAR, 2011), a fungos micorrízicos arbusculares (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006) e aqueles causados sobre o sistema simbiótico rizóbio-FMA-planta (PEREIRA et al., 1991).

Dos vários micro-organismos que colonizam a rizosfera, os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) ocupam uma posição ecológica única, pois

eles apresentam-se parcialmente dentro e parcialmente fora do hospedeiro. A fase interna dos fungos micorrízicos além de receber do hospedeiro proteção à ação de competidores e antagonistas, tem nele uma fonte de nutrientes. Essa vantagem os habilita a executar uma grande e maior biomassa funcional no mais íntimo contato com as raízes (BAGYARAJ, 1984). Cerca de 80% das plantas terrestres estão associadas com FMA estabelecendo uma simbiose mutualística permanente e íntima, denominada micorrizas arbusculares (MA) (STRACK et al., 2003). Estas associações ocorrem em ecossistemas terrestres em todo o mundo e têm um impacto global sobre a absorção de nutrientes (HARRISON, 2005), em especial os de baixa mobilidade no solo, como fósforo.

Existem diversos relatos sobre efeitos benéficos resultantes da interação entre bactérias diazotróficas e FMA (BAREA et al., 2005; BHOWMIK; SINGH, 2004). De acordo com Artursson et al. (2006), os benefícios da interação FMA-bactéria diazotrófica podem ocorrer em razão do incremento na absorção de P pelas plantas micorrizadas, o que proporciona melhores condições para o estabelecimento da associação com diazotróficos, o que representa, por sua vez, alto custo energético. Essas interações podem ser de extrema importância para uma agricultura com menor emprego de insumos químicos, como os fertilizantes nitrogenados e fosfatados (SALA; FREITAS; SILVEIRA, 2007; SIQUEIRA; KLAUBERG-FILHO, 2000).

A sobrevivência dos FMA e sua efetividade em promover uma resposta positiva no crescimento vegetal podem estar fortemente influenciadas por micro-organismos na micorrizosfera (AMES; BETHLENFALVAY, 1987ab; BAREA; AZCON; AZCÓN-AGUILAR, 1994; BAREA et al., 2005; BAGYARAJ, 1984; LINDERMAN, 1992). São de particular interesse aqueles micro-organismos que colonizam os esporos e hifas de FMA. Muito desses micro-organismos tem sido evidenciados como sendo actinomicetos parasitas (LEE; KOSKE, 1994), mas micro-organismos benéficos também podem estar presentes. Fungos, bactérias e actinomicetos têm sido observados na superfície de esporos de FMA (AMES; MIHARA; BETHLENFALVAY, 1987; BHATTACHARJEE et al., 1982; GERDEMANN; TRAPPE, 1974; ROSS; DANIELS, 1982). As substâncias antibióticas produzidas em cultura por

actinomicetos são capazes de inibir o crescimento ou causar a eliminação de populações de bactérias, leveduras e várias categorias taxonômicas de fungos (ALEXANDER, 1977) incluindo aí os fungos micorrízicos arbusculares (KRISHNA; BALAKRISHNA; BAGYARAJ, 1982; ROSS; DANIELS, 1982).

Alguns FMA têm estabelecido um tipo particular de simbiose com uma bactéria endosimbiótica, previamente identificada como do gênero *Burkholderia* (BIANCIOTTO et al., 2002; BIANCIOTTO; BONFANTE, 2002) e reclassificado como um novo táxon denominado de '*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*' (JARGEAT et al., 2004). E de acordo com BAREA et al. (2005), estas bactérias têm interessantes genes metabólicos que podem influenciar funções de MA e investigações em curso visam explorar esta interação cooperativa.

Nas últimas décadas um dos ramos das pesquisas em Microbiologia do Solo caminha no sentido de estudar as relações que ocorrem entre os microorganismos rizosféricos e entre estes e as raízes das plantas, e em que podem interferir no hospedeiro. É nesse contexto que o estudo das interações entre FMA e outros microrganismos do solo (incluindo aí os actinomicetos e rizóbio), se reveste de grande importância por que: (1) pode subsidiar uma melhor compreensão da ecologia da rizosfera bem como dos aspectos sinecológicos de ecossistemas terrestres (função das interações nos ecossistemas); (2) situa a micorrizalogia numa perspectiva sistêmica (estudo dos FMA localizado num ambiente de coexistência de várias outras interações complexas que constituem a totalidade da rizosfera) e (3) aponta para as implicações ecológicas e práticas quanto ao potencial de uso dessas interações num modelo de desenvolvimento agrícola sustentável.

O objetivo desse trabalho é avaliar as interações biológicas na rizosfera de soja envolvendo fungos micorrízicos arbusculares (FMA), rizóbio e actinomicetos isolados de solo de região produtora de soja.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

O solo como um sistema complexo é determinado por diversas e numerosas interações entre seus componentes químicos, físicos e biológicos e é modulado pelas condições ambientais predominantes (BUSCOT, 2005). Representa um ambiente heterogêneo que permite o desenvolvimento de uma grande diversidade de micro-organismos, cujo equilíbrio é afetado por fatores bióticos e abióticos do ambiente.

De modo particular, a diversidade genética e funcional de atividades das populações microbianas exerce um forte impacto nas funções do solo, pois os micro-organismos são forças motrizes para processos metabólicos fundamentais que envolvem atividades enzimáticas específicas (NANNIPIERI et al., 2003). Muitas interações microbianas, reguladas por sinais ou moléculas específicas (PACE, 1997), são responsáveis por desencadear processos ambientais importantes, como a gênese do solo, ciclagem biogeoquímica de nutrientes, bem como a manutenção da saúde das plantas e da boa qualidade do solo (BAREA; AZCÓN; AZCÓN-AGUILAR, 2004; NANNIPIERI et al., 2008).

### **2.1. A Rizosfera**

A rizosfera, definida por Hiltner (1904), como o volume do solo adjacente e influenciado pelas raízes das plantas é tida como um ambiente rico em populações microbianas (BAGYARAJ, 1984; FIGUEIREDO et al., 2008) que podem influenciar o crescimento das plantas e tem se tornado objeto de estudo da Ecologia Microbiana do Solo. Constitui-se em um dos mais fascinantes habitat microbiano e é moldada pelo solo, pela planta e pelos micro-organismos (CHAUHAN et al., 2011). A atividade microbiana na rizosfera afeta os padrões de desenvolvimento radicular e da oferta de nutrientes disponíveis às plantas, modificando assim a qualidade e quantidade de exsudatos radiculares (BAREA, 2000; BOWEN; ROVIRA, 1999; GRYNDLER, 2000). Segundo Barea et al. (2005), dois tipos de interações na rizosfera são reconhecidos, as interações envolvendo detritos de material vegetal e que afetam os fluxos de energia e nutrientes; e as interações nas raízes vivas das plantas. Ambos os tipos de interações são relevantes tanto para agronomia quanto para a

ecologia. Assim, a rizosfera representa a região do solo que tem um gradiente microbiológico, onde ocorrem trocas metabólicas das raízes com micro-organismos e vive-versa; e entre os micro-organismos. Estas interações decrescem com o distanciamento da influência das raízes (ANDRADE; NOGUEIRA, 2005; ROVIRA; DAVEY, 1974).

Existem três componentes reconhecidos na rizosfera que interagem entre si: a rizosfera (solo), que é a zona do solo influenciada pelas raízes através da liberação de substratos que afetam a atividade microbiana; o rizoplano ou a superfície da raiz, incluindo a elevada aderência de partículas do solo; e a raiz propriamente dita com o tecido radicular. Com relação à colonização de micro-organismos nestes componentes, tem-se a colonização de tecidos da raiz por micro-organismos endófitos (BOWEN; ROVIRA, 1999; KENNEDY, 1998) e a colonização microbiana do rizoplano, ambas consideradas como colonização radicular ou de raízes, enquanto que a colonização do volume de solo adjacente e influenciado pela raiz é considerada como colonização rizosférica (KLOEPPER, 1994; KLOEPPER et al., 1991). A rizosfera pode ser ainda dividida, em ectorrizosfera e endorrizosfera, compreendendo a parte externa e os tecidos corticais respectivamente (CARDOSO; NOGUEIRA, 2007). Os exsudatos produzidos e liberados na rizosfera afetam o crescimento de plantas e de micro-organismos presentes no solo (ANDRADE; NOGUEIRA, 2005; JEFFRIES et al., 2003).

Bactérias colonizadoras da rizosfera ou rizobactérias causam efeitos benéficos sobre o desenvolvimento das plantas através de mecanismos diretos ou indiretos e foram definidas como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas ou como são conhecidas (PGPR), do inglês Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009). Segundo estes autores as PGPR têm sido relatadas pela importância em melhorar diretamente o crescimento das plantas por uma variedade de mecanismos, tais como: a fixação biológica de nitrogênio atmosférico que é transferido para a planta, como faz os rizóbios em plantas leguminosas como a soja; a produção de sideróforos quelantes de ferro que em altas concentrações pode inibir o crescimento de fitopatógenos atuando assim no controle biológico de algumas fitopatologias; solubilização de fosfatos orgânicos ou inorgânicos, contribuindo

na disponibilização de fósforo às plantas e síntese de fitormônios. Melhoria direta da absorção de minerais devido ao aumento nos fluxos de íons específicos na superfície da raiz na presença de PGPR também tem sido relatada. Portanto, vários mecanismos têm sido descritos relatando o benefício de PGPR no crescimento de plantas, tais como aqueles de promoção direta de crescimento que incluem (a) biofertilização, (b) estimulação de crescimento radicular, (c) rizomediação e (d) controle de *stress* da planta e também aqueles mecanismos de controle biológico com os quais as rizobactérias podem promover indiretamente o crescimento de plantas, por reduzir os níveis de doença, incluindo aí antibioses, indução a resistência sistêmica, e competição por nutrientes e nichos.

Esta região de maior atividade física, química e principalmente biológica apresenta grande interesse agrônomo e ecológico, pois através da exsudação de substâncias radiculares, ocorre a formação de substratos microbianos, que além de servirem de habitat para os organismos, e estimularem o desenvolvimento da microbiota do solo, representa a interface de comunicação entre as plantas e seu substrato, o solo (KILLHAM, 1994; SIQUEIRA, 1993).

A inoculação de micro-organismos benéficos em plantas tem sido empregada para melhorar seu desenvolvimento e aumentar a tolerância a doenças, além de favorecer seu estabelecimento frente a condições adversas, como salinidade e estresse hídrico. Dentre os grupos de micro-organismos com comprovado potencial de benefício para as plantas, têm-se as bactérias do gênero rizóbio, bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares (FMA), (SOUCHIE et al., 2005).

Os métodos atuais para o estudo das interações entre os micro-organismos na rizosfera incluem desde o tradicional uso de microscopia eletrônica até as técnicas mais modernas de biologia molecular. A análise dessas metodologias usadas continua a ser um tópico de interesse, e descrições de vários métodos e técnicas são comuns na literatura (BIANCIOTTO et al., 1996; HUNGRIA; ARAÚJO, 1994; NORRIS; READ; VARNA, 1994; PAUL; CLARK, 1989; VARMA, 1998).

## 2.2. O cultivo da soja, o rizóbio (*Bradyrhizobium*) e a fixação biológica de nitrogênio

O cultivo da soja tem como principal fonte de nitrogênio a fixação biológica de  $N_2$ , através da simbiose com estirpes do gênero *Bradyrhizobium*. Estirpes com maior eficiência simbiótica têm sido identificadas para a soja, no entanto, tem sido difícil o estabelecimento destas estirpes superiores em solos com histórico de cultivo anterior (NEVES et al., 1992).

De acordo com Assumpção et al. (2009) a cultura da soja, *Glycine max* (L.) Merrill, tem posição de destaque na agricultura mundial, com rendimento anual de aproximadamente U\$ 215 bilhões. Esta cultura encontrou na fixação biológica de nitrogênio (FBN) um dos principais fatores de competitividade no mercado mundial (ZILLI et al., 2008). Com a exploração desta tecnologia, que é prática amplamente difundida e utilizada pelos produtores de soja no Brasil, estima-se a economia de fertilizantes nitrogenados em três bilhões de dólares anuais (HUNGRIA et al., 2005).

Os rizóbios são micro-organismos rizosféricos heterotróficos comuns dos solos tanto das regiões temperadas como das regiões tropicais, mas não são membros dominantes da comunidade microbiana (NEVES; RUMJANEK, 1996) e, assim como todas as bactérias diazotróficas utilizam como fonte de nitrogênio para seu metabolismo a matéria orgânica do solo. Estes micro-organismos simbiontes possuem um complexo enzimático chamado nitrogenase, indispensável para a transformação do nitrogênio gasoso ( $N_2$ ) em amônia que é subseqüentemente assimilada em aminoácidos e proteínas.

Atualmente, existe referência a quatro estirpes utilizadas como inóculo para sojicultura: SEMIA 587 e SEMIA 5019 de *Bradyrhizobium elkanii* e SEMIA 5079 e SEMIA 5080 de *Bradyrhizobium japonicum* (BIZARRO et al., 2011).

A fixação biológica de nitrogênio associada à soja, por diminuir o custo de produção, favoreceu a rápida expansão desta cultura no Brasil (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003; ALVES et al., 2006; DE-POLLI; NEVES, 1996). Segundo a FAO (1992), a soja é a leguminosa mais plantada no mundo e sua importância no Brasil, é cada vez maior, não só pelas divisas ganhas com a exportação, mas pela elevada taxa de proteína de seus grãos, cerca de 40%, o

que torna o uso dessa leguminosa cada vez mais freqüente, direta ou indiretamente, na dieta do brasileiro (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003; VARGAS; HUNGRIA, 1997).

No Brasil, desde a expansão comercial da cultura da soja na década de 1960, grandes esforços foram empreendidos no melhoramento das cultivares e na seleção de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii*, para tornar viáveis taxas elevadas de fixação biológica do nitrogênio (FBN) (HUNGRIA et al., 2006). De acordo com estes autores, até 94% do N requerido pelas cultivares mais produtivas pode ser fornecido pela FBN, o que permite rendimentos superiores a 4.000 kg ha<sup>-1</sup>.

### **2.3. A microbiota rizosférica e suas interações**

Existe uma grande diversidade biológica na microbiota rizosférica: bactérias fixadoras de nitrogênio (simbióticas ou diazotróficas associativas), actinomicetos, fungos micorrízicos, fungos patogênicos, rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP), bactérias solubilizadoras de fosfato (BSF), bactérias da ciclagem de nutrientes (NCB-*"Nutrient Cycling Bacteria"*) e bactérias fitopatogênicas constituem alguns deles. Estes microorganismos vivem ou na endorizosfera (colonizando a região cortical da raiz), em íntima associação com a superfície da raiz ou rizoplano, ou na ectorizosfera. Portanto, eles coexistem e interagem de modo a formar a comunidade microbiana rizosférica tanto nos ecossistemas naturais como nos agroecossistemas. Tais interações que podem ser positivas ou negativas (ATLAS; BARTHA, 1993) na sua totalidade garantem o balanço ecológico dessa comunidade que se constitui na principal força motriz do sistema solo-planta (ANDRADE; NOGUEIRA, 2005; AZCÓN-AGUILAR; BAREA, 1996; BAREA; AZCÓN-AGUILAR, 1982; CARDOSO; NOGUEIRA, 2007) e existem evidências que estas interações ocorrem ou ao nível de colonização rizosférica (estágio de formação da interação) e/ou ao nível funcional e nutricional (estágio de desenvolvimento e atividade da interação e de sua influência no status nutricional da planta).

Os micro-organismos na rizosfera vivem em pequenos habitats onde eles interagem. Interações positivas, negativas ou neutras têm sido observadas (ARAÚJO, 2008; KILLHAM, 1994). Os fungos micorrízicos como habitantes ubíquos do solo estão “imersos” numa rede de interações microbianas que tomam lugar nos micro-habitats do solo, mas a compreensão desses fatos é ainda escassa e fragmentada (BAREA; AZCON-AGUILAR, 1982, BAREA; AZCON; AZCÓN-AGUILAR, 1994; 2002; REID, 1990). Coleman (1985) enfatiza que as interações micro-organismos-raiz são o caminho para a compreensão da função dos ecossistemas, e situa as micorrizas numa perspectiva de muitas outras interações complexas que tomam lugar na rizosfera. Assim, Hunt et al., (1987), no modelo de interações tróficas entre plantas, substratos, microflora e microfauna, atentam para pôr as micorrizas num contexto de substratos lábeis e resistentes, de decompositores primários e de vários níveis de predadores microbianos. Os autores discutem a relativa importância de bactérias e FMA como mineralizadores primários de nitrogênio (N) e então, por sua vez, como a transferência desse elemento numa teia alimentar decompositora é quantitativamente influenciada pela fauna predadora da microflora.

As interações entre micro-organismos rizosféricos são de grande importância porque vão influenciar a colonização microbiana da superfície da raiz, o rizoplane, e, conseqüentemente, a infecção da raiz, tanto pelos simbiontes parasitas, como pelos simbiontes mutualistas (AZCÓN-AGUILAR; BAREA, 1996).

Muitas bactérias, através de interações diretas ou indiretas com as raízes de plantas, são conhecidas por serem capazes de estimular e promover o crescimento vegetal e por isso foram classificadas como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. Além disso, a maioria das raízes das plantas são colonizadas por fungos micorrízicos e sua presença também estimula o crescimento do fitossimbionte. No entanto, os efeitos benéficos da raiz colonizada por bactérias e FMA têm sido estudados separadamente. Só recentemente é que os efeitos sinérgicos de bactérias e fungos micorrízicos estão sendo estudados em relação aos seus impactos benéficos combinados em plantas, no qual os fungos FMA e bactérias podem interagir sinérgicamente para estimular o crescimento das plantas através de uma série de mecanismos

que incluem a melhoria de aquisição de nutrientes e inibição de fitopatógenos fúngicos (ARTURSSON; FINLAY; JANSSON, 2006; BIRÓ et al., 2000).

Segundo Artursson, Finlay e Jansson (2006), embora existam muitos estudos sobre as interações entre FMA e bactérias, os mecanismos subjacentes dessas associações são em geral não muito bem compreendidos, e suas propriedades funcionais ainda requerem confirmação experimental. Pesquisas futuras, devem se esforçar no sentido de uma melhor compreensão dos mecanismos funcionais dessas interações microbianas, de modo que as combinações de micro-organismos podem ser aplicadas como inoculantes eficazes dentro de sistemas sustentáveis de produção agrícola.

Entendimento das interações entre os micro-organismos encontrados rotineiramente na rizosfera é essencial para descrever a natureza da interface solo-planta. Geralmente afirma-se que fungos micorrízicos graças a melhor exploração da rizosfera pelas hifas, absorve mais nutrientes para as plantas, em troca recebem carboidratos da planta que são essenciais para a conclusão do ciclo de vida dos fungos. Isso mantém o conceito de simbiose mutualística, ou seja, uma interação de benefício para ambas as partes (BONFANTE; ANCA, 2009).

Durante o processo de colonização rizosférica, os micro-organismos estabelecem interações diversas entre si e com a planta. Tais interações podem influenciar o estabelecimento de rizocolonizadores benéficos, bem como o estabelecimento das associações simbióticas. Neste contexto, micro-organismos como os actinomicetos podem afetar a capacidade competitiva das estirpes de *Bradyrhizobium* spp. pelos sítios de nodulação e, conseqüentemente, influenciar tanto a nodulação da soja como a fixação biológica do N<sub>2</sub>, bem como influenciar o estabelecimento de fungos micorrízicos-arbusculares.

#### **2.4. Algumas funções de actinomicetos em solos**

Actinomicetos são encontrados em muitos habitats e têm sido identificados como um dos principais grupos de micro-organismos na comunidade microbiana dos solos (KUSTER, 1986; SATHEEJA; JEBAKUMAR,

2011) e sua participação nas alterações dos componentes do solo e especialmente nas transformações dos compostos orgânicos tem sido mencionada há tempo por vários autores (HUNTJENS, 1972; KONONOVA, 1986; KUSTER, 1967; KUTZNER, 1968; SATHEEJA; JEBAKUMAR, 2011). Normalmente, 10 a 50% da comunidade microbiana do solo são constituída por populações de actinomicetos (ALEXANDER, 1977), entretanto, em alguns solos, como os dos cerrados brasileiros, estes micro-organismos podem compor de 74 a 95% da comunidade microbiana (COELHO; DROZDOWICZ, 1978), com predominância do gênero *Streptomyces*. Sua estrutura morfológica é semelhante aos filamentos dos fungos (hifas), porém são muito mais finos, usualmente com 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$  em diâmetro, com dimensão análoga a de células bacterianas, mas em alguns gêneros podem ter acima de 2,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro (ALEXANDER, 1977).

Esses micro-organismos têm recebido atenção especial pelos seus diversos papéis no solo. Atuam na decomposição da matéria orgânica do solo e contribuem na estruturação do solo, através de ligações de suas hifas com as partículas do solo (PEREIRA, 1995). Podem atuar como promotores de crescimento vegetal e agentes potenciais de controle biológico de fitopatógenos (GAVA, 1998; MOURA, 1996). Entretanto a importância destes micro-organismos no solo tem sido mais relacionada com a síntese de antibióticos e outros compostos biologicamente ativos (WELLINGTON; TOTH, 1992). Tais compostos podem ser produzidos em ecossistemas naturais e agroecossistemas e no solo podem apresentar efeitos antagônicos a diversas populações da comunidade microbiana (TURPIN, 1992).

## **2.5. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), as micorrizas arbusculares (MA) e a micorrizosfera**

Os fungos simbióticos que predominam nas raízes e solos de culturas agrícolas e ecossistemas florestais são os FMA, reclassificados por Morton e Benny (1990) como fungos da ordem Glomales do filo Zygomycota (REDECKER; MORTON; BRUNS, 2000) e atualmente definidos como pertencentes ao filo Glomeromycota (SCHÜßLER; SCHWARZOTT; WALKER,

2001), Classe Glomeromycetes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006) e apresentando quatro ordens: Diversisporales, Glomerales, Archaeosporales e Paraglomerales (BERBARA; SOUZA; FONSECA, 2006). Estes autores apresentam uma sinopse interessante sobre a evolução histórica da classificação e nomenclatura dos FMA.

A colonização do sistema radicular por FMA confere benefícios diretamente para o crescimento e desenvolvimento da planta, aumentando a absorção de nutrientes pelas raízes e também melhorando a tolerância de plantas a condições de estresse e ao ataque de patógenos do solo. O uso de FMA em sistemas de produção agrícola é cada vez maior, e estudos têm aumentado consideravelmente nos últimos anos (ARTURSSON; FINLAY; JANSSON, 2006; BONFANTE; ANCA, 2009; SALVIOLI, et al., 2010).

A habilidade dos FMA em aumentar a absorção de nutrientes pouco móveis no solo pelos fitossimbiontes, em particular fósforo (P), e outros micronutrientes, tem sido reconhecida como os efeitos mais benéficos das MA. Interações rizosféricas ocorrem entre FMA e outros micro-organismos com efeitos sobre o balanço nutricional das plantas, tais como as bactérias fixadoras de nitrogênio e rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PAULA; SIQUEIRA; DÖBEREINER, 1993). Além disso, a colonização rizosférica por FMA protege as plantas contra patógenos e podem aliviar a toxicidade do alumínio. As hifas extraradiculares de FMA contribuem com a agregação do solo e estabilidade estrutural. Portanto, as micorrizas arbusculares potencialmente melhora a qualidade física do solo (através das hifas externas), qualidade química do solo (através do aumento na absorção de nutrientes) e qualidade biológica do solo (através da teia alimentar do solo), (CARDOSO; KUYPER, 2006).

Os FMA são asseptados e colonizam as raízes de plantas de quase todos os gêneros das Gimnospermas e Angiospermas, além de alguns representantes das Briófitas e Pteridófitas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006) formando as micorrizas arbusculares (MA).

As micorrizas arbusculares (MA) são as mais comuns entre as micorrizas e constituem sistema simbiótico com culturas de interesse agrônômico, pastoril e florestal. Os FMA penetram nas células corticais da raiz

e se diferenciam em estruturas arbusculares especializadas. Os arbúsculos envolvidos por uma plasmalema intacta do hospedeiro aumentam a área da superfície de troca de metabólitos entre os simbioses (SIQUEIRA et al., 1994). O micélio externo do FMA, que se estende solo adentro, aumenta o potencial de absorção de água e de nutrientes pelo sistema radicular, e contribui fortemente para o melhoramento da estrutura do solo por melhorar a aeração e percolação da água (LINDERMAN, 1992).

Esta simbiose mutualística provoca mudanças morfológicas e fisiológicas nas raízes da planta, causando implicações na fisiologia do resto da planta. Quando as plantas tornam-se micorrizadas ocorrem alterações nas concentrações de hormônios de crescimento como as auxinas, citocininas e giberelinas, aumento da taxa fotossintética e mudanças na partição de fotossintatos para a parte aérea e para as raízes, mudanças no status nutricional do tecido hospedeiro em resposta a alteração na absorção de minerais do solo. As alterações nos aspectos bioquímicos e estruturais das células hospedeiras interferem na permeabilidade da membrana, e assim na qualidade e quantidade da exsudação radicular (LINDERMAN, 1992). Estas alterações na exsudação das raízes podem induzir a mudanças na composição da microbiota da rizosfera ou micorrizosfera. Portanto, evidencia-se uma série de mudanças morfo-fisiológicas entre os simbioses com efeitos subsequentes (“efeito cascata”) de modo a afetar quantitativamente e qualitativamente a comunidade microbiana da rizosfera. Segundo Cardoso e Nogueira (2007), assim como os FMA influenciam a comunidade microbiana na rizosfera, o inverso também é verdadeiro.

O termo micorrizosfera inicialmente descrito por Oswald e Ferchau (1968), refere-se à zona de influência das micorrizas (interface fungo-raiz) no solo. A micorrizosfera tem dois componentes: um deles é a rizosfera, uma fina camada de solo que envolve a raiz e está sob a interação e influência direta da raiz, pelos radiculares e hifa do FMA adjacente à raiz. O outro, é a hifosfera, que é uma zona de influência direta das hifas de FMA onde se evidencia as interações solo-MA (MARSCHNER, 1995).

De acordo com Andrade; Linderman; Bethlenfalvay (1998) e Nogueira (2002) as superfícies do micélio e dos esporos dos FMA são colonizadas por

bactérias e outros microrganismos que crescem no material mucilaginoso que os recobre. Andrade et al. (1997) demonstraram que tanto a micorrizosfera quanto a hifosfera de diferentes espécies de FMA do gênero *Glomus* são colonizadas por diferentes espécies de bactérias, determinando-se ainda que algumas espécies bacterianas têm especificidade pela micorrizosfera, enquanto que outras pela hifosfera.

Os eventos que ocorrem no solo da micorrizosfera são influenciados pelo hospedeiro, pelo pH do solo, umidade, conteúdo de nutrientes e de matéria orgânica, e propriedades físicas do solo. Esses fatores edáficos, bem como fatores ambientais, climáticos e da cultura incluindo aplicações químicas podem influenciar a fisiologia e o crescimento da planta hospedeira, assim como mudanças no genótipo do fitossimbionte poderá alterar a natureza da simbiose MA (AHMAD, 1995; KRISHNA et al., 1985).

## **2.6. Interações entre FMA, actinomicetos e rizóbio**

Os tipos de interações documentados na literatura envolvendo FMA, actinomicetos e rizóbios compreendem interações benéficas (sinergismo), bem como interações deletérias (parasitismo, competição e antagonismo).

As interações entre plantas, fungos micorrízicos, e bactérias, podem ser definidas como associações tripartite. Alguns dos mecanismos e muitas vezes estratégias nutricionais levam à promoção do crescimento de plantas. Liberação de moléculas ativas, incluindo substâncias voláteis, e contato físico entre os simbiossomas parecem importantes para o estabelecimento da simbiose planta / bactéria / rede de fungos micorrízicos (BONFANTE; ANCA, 2009).

Quando os FMA se associam com as raízes do fitossimbionte, eles podem interagir diretamente com outros micro-organismos do solo, ou podem influenciar os demais micro-organismos indiretamente através de alterações na fisiologia da planta hospedeira, incluindo a fisiologia da raiz, e assim os padrões de exsudação na micorrizosfera. Do mesmo modo, outros micro-organismos rizosféricos, como os actinomicetos, podem diretamente ou indiretamente influenciar o comportamento dos FMA através de interações aleloquímica do tipo antagonica (supressiva) ou do tipo sinérgica

(estimulatória), por parasitismo da parede celular de esporos e de hifas (ação quitinolítica), ou por modificações na fisiologia da planta hospedeira (AMES, 1989).

Diversos micro-organismos, benéficos ou não, podem estar presentes na superfície ou dentro de esporos e em hifas de FMA. Alguns FMA têm estabelecido um tipo particular de simbiose com uma bactéria endossimbiótica *Burkholderia* (BIANCIOTTO et al., 2002; BIANCIOTTO; BONFANTE, 2002) e reclassificada como '*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*' (JARGEAT et al., 2004). Estas bactérias podem influenciar funções de micorrizas arbusculares (BAREA et al., 2005).

As interações entre micro-organismos rizosféricos são de importância relevante porque melhoram a nutrição, desenvolvimento e influenciam o estabelecimento vegetal; e conseqüentemente a produtividade agrícola. Inconsistências freqüentemente ocorrem em testes de campo quanto ao uso de inoculantes microbianos efetivos para o desenvolvimento vegetal, provavelmente devido aos micro-organismos competidores, associativos ou antagônicos.

Considerando o exposto acima, duas linhas de pesquisas podem ser destacadas: (1) estudos acerca do estabelecimento de micro-organismos na rizosfera (micorrizosfera) com ênfase na dinâmica da infecção e colonização microbiana da interface raiz-solo e no modo de interação desses micro-organismos; e (2) estudos acerca dessas interações microbianas como ferramenta biotecnológica para o aumento do desenvolvimento vegetal. Estes estudos devem estar pautados no modelo de desenvolvimento agrícola sustentável.

Interações entre fungos MA e outros micro-organismos do solo têm sido avaliadas (BAGYARAJ, 1984; BAREA et al., 2002; 2005; BAREA; AZCON-AGUILAR, 1982; BAREA; AZCON; AZCÓN-AGUILAR, 1994; LINDERMAN, 1992; FITTER; GARBAYE, 1994; CERVANTES; RODRÍGUEZ-BARRUECO, 1994). Os aspectos mais estudados acerca dessas interações dizem respeito aos efeitos da microbiota do solo sobre a formação e função dos fungos micorrízicos arbusculares e a influência das MA sobre as alterações na

comunidade microbiana da rizosfera. Outro aspecto de importância e que vem sendo pouco estudado é o significado dessas mudanças sobre o desenvolvimento e a sanidade do fitosimbionte (LINDERMAN, 1992).

De acordo com Moreira e Siqueira (2006), os actinomicetos do solo produzem substâncias voláteis com alta atividade inibitória na germinação de esporos de certas espécies de FMA. Por outro lado, alguns organismos, como os rizóbios produtores de enzimas hidrolíticas, as bactérias solubilizadoras de fosfato e *Azotobacter*, que facilitam a penetração das raízes pelo fungo, formam associações sinérgicas com os FMA, sendo conhecidas como “helpers” (auxiliadores).

### **a) Sinergismo**

O sinergismo é um tipo de interação positiva onde ocorre o intercâmbio de compostos entre duas populações, favorecendo a ambas, mas sem haver simbiose (CARDOSO, 1992). Grande parte dos trabalhos encontrados na pesquisa bibliográfica relata a ocorrência deste tipo de interação, em que populações de fungos e bactérias colonizam as raízes da planta hospedeira, utilizando-se dos exsudados das raízes, e fornecendo nutrientes em troca.

Espécies de fungos micorrízicos arbusculares têm sido encontradas constituindo um sistema simbiótico triplo com actinomicetos fixadores de nitrogênio pertencentes ao gênero *Frankia*. Essa interação tem sido reportada como sendo benéfica para ambos os simbiossiontes tendo sido caracterizada como sinergismo (CERVANTES; RODRÍGUEZ-BARRUECO, 1994).

Os actinomicetos fixadores de nitrogênio estão representados pelo gênero *Frankia*, que se associam com cerca de 200 espécies de plantas subordinadas as famílias Betulaceae, Casuarinaceae, Coriariaceae, Datisceae, Elaeagnaceae, Myricaceae, Rhamnaceae e Rosaceae, formando nódulos denominados actinorrizas. O nódulo de plantas actinorrízicas é uma estrutura perene formada nas ramificações das raízes laterais, e que termina em um nódulo lobular. Os nódulos podem ser classificados em 2 grupos morfológicos distintos: nódulos encontrados em *Alnus* (Betulaceae), e os encontrados em *Casuarina* (Casuarinaceae) e *Myrica* (Myricaceae). A infecção

do micro-organismo ocorre através do pelo radicular, com a formação de um nódulo primário e de uma hifa intercelular. Em seguida, as células do córtex da raiz sofrem divisões, com a penetração das hifas nas células, ocorrendo à formação de um ramalhete de hifas com vesículas nas extremidades, resultando na formação do nódulo definitivo. As vesículas encontradas nos nódulos têm importante função na atividade da nitrogenase (AUER E SILVA, 1992). Estudos desenvolvidos por Becking (1977) demonstraram que a região intermediária do nódulo apresenta uma maior concentração de vesículas, sendo que a maior fixação ocorre nesta região.

Rose (1980) publicou um levantamento da colonização de raízes por micorrizas em 25 espécies noduladas por actinomicetos. Foram encontrados 100% de colonização por micorrizas. Sendo que duas espécies estavam colonizadas por ectomicorrizas, 6 apresentavam associações com ecto e endomicorrizas e 17 com endomicorrizas. Tais associações permitiram ao hospedeiro uma maior adaptabilidade e capacidade para colonizar sítios perturbados, mostrando que a associação fitossimbionte x bactéria endofítica fixadora de nitrogênio x fungos micorrízicos pode ser essencial para o sucesso da colonização natural em áreas perturbadas.

Tem sido mostrado que essa interação entre fungos MA e actinorriza tem proporcionado um aumento na absorção de fósforo pela planta bem como um aumento na nodulação e fixação biológica de nitrogênio (FBN) (GAUTHIER, 1983; GARDNER, 1986). A principal razão do efeito positivo dessa interação está relacionada ao fato de que o fungo MA pode satisfazer a alta demanda de P para o processo da FBN (CERVANTES; RODRÍGUEZ-BARRUECO, 1994).

Os fungos MA não fixam  $N_2$  atmosférico, porém esses micro-organismos biotróficos obrigatórios são hábeis em incrementar o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) realizado por bactérias simbióticas (actinomicetos - *Frankia*) e por bactérias associativas ou de vida livre, bem como em interagir positivamente com bactérias fixadoras de vida livre ou associativas. Os fungos MA favorecem a aquisição de  $N_2$  através de efeitos indiretos nas simbioses fixadoras desse nutriente e no aumento da absorção de N no solo (BAREA; AZCÓN-AGUILAR, 1983; MARSCHNER; DELL, 1994). Tanto as hifas quanto as raízes micorrizadas são capazes de absorver N de várias formas

(preferencialmente na forma de  $\text{NH}_4^+$ ) e transferí-lo para a planta, desempenhando papel de grande importância na aquisição de N em ecossistemas naturais e evitando perdas de  $\text{NO}_3^-$  por lixiviação (MARSCHNER; DELL, 1994).

As bactérias diazotróficas podem auxiliar, por meio de diversos mecanismos, na nutrição nitrogenada das culturas, como o aumento do processo da redução assimilatória de nitrato disponível no solo, pela fixação biológica do  $\text{N}_2$  (FBN) e pela produção de fitormônios que interferem no crescimento das plantas e podem alterar a morfologia das raízes, o que possibilita a exploração de maior volume de solo (ZAIED et al., 2003).

Estudo de inoculação simultânea de fungos micorrizicos arbusculares com bactérias diazotróficas tem evidenciado que essas bactérias podem incrementar o desenvolvimento e os teores de nutrientes nas plantas, a colonização micorrízica e a esporulação dos FMA. Dessa forma, as bactérias diazotróficas associadas a esporos de FMA podem promover o aumento e rápida colonização pelo fungo, o que pode favorecer o desenvolvimento de um inoculante comercial de FMA (BHOWMIK; SINGH, 2004).

O efeito benéfico propiciado pela interação entre os FMA e bactérias diazotróficas pode ocorrer pelo incremento na absorção de P pelas plantas micorrizadas, proporcionando melhores condições para o estabelecimento da associação com as diazotróficas, que apresenta elevado custo energético (BALOTA et al., 1995).

## **b) Parasitismo, antagonismo e competição**

Os fungos MA influenciam e são influenciados pela atividade dos microorganismos no solo (AMES; MIHARA; BAYNE, 1989; AMES; MIHARA; BETHLENFALVAY, 1987; AMES; REID; INGHAM, 1984; BAGYARAJ, 1984; MEYER; LINDERMAN, 1986b). Desse modo, se faz importante o conhecimento da ecologia dos vários grupos da biota do solo que interagem com o fungo MA. Aumento no desenvolvimento da planta devido à inoculação com fungo MA é bem conhecido; entretanto o máximo benefício pode ser adquirido através de

um melhor entendimento de como os micro-organismos do solo afetam sua sobrevivência (AMES, 1989).

Gerdemann e Trappe (1974) acreditaram que a ação digestiva observada nas paredes de esporos de FMA tenha sido causada por actinomicetos e estes são os mais comuns dos organismos decompositores de quitina no solo (VELDKAMP, 1955). A quitina, um polímero de N-acetilglicosamina é um importante constituinte estrutural das paredes das células da maioria dos fungos incluindo FMA (MEUZELAAR, 1978; VELDKAMP, 1955; WEIJMAN).

Ames (1989), evidenciaram uma diversidade de actinomicetos decompositores de quitina, associados com esporos e hifas de *Glomus macrocarpum*. Dos micro-organismos decompositores de quitina (MDQ) que colonizaram os esporos dessa espécie de fungo MA, 82% eram actinomicetos e desses a maioria pertencia ao gênero *Streptomyces*. O fato desses isolados produzirem quitinase e estarem colonizando a parede do espora de *G. macrocarpum* sugere uma relação de parasitismo entre esses micro-organismos.

Várias observações sugerem que fungos e actinomicetos parasitas podem significativamente reduzir populações de esporos de fungos MA e induzem efeitos diversos sobre as plantas com dependência micorrízica (DANIELS; MENGE, 1980; ROSS; PAULITZ; MENGE, 1986; RUTTENCUTTER, 1977; ROSS; DANIELS, 1982).

Lee e Koske (1994) isolaram 44 espécies de fungos e 06 espécies de actinomicetos da superfície de esporos desinfectados de *Gigaspora gigantea*, o que sugere que esses micro-organismos podem colonizar e viver dentro dos esporos podendo afetar a dinâmica populacional dos fungos micorrízicos arbusculares nos ecossistemas naturais e agroecossistemas. Do total desses micro-organismos, 31 isolados foram testados quanto à capacidade de parasitar os esporos do fungo micorrízico em questão. Desses, 22 se mostraram parasitas ao fungo através da formação de estruturas do tipo projeções internas, canais radiais finos ou ambos na parede do espora. Dos actinomicetos testados, *Nocardia* sp. e *Streptomyces* sp. induziram a formação

de projeções internas e quanto aos fungos a patogenicidade foi maior para *Verticillium* e *Acremonium*.

Vários pesquisadores têm investigado a população de micro-organismos associada aos esporos de fungos MA coletados em campo ou cultivados em vaso.

Secilia e Bagyaraj (1987) analisaram quanti e qualitativamente as populações de bactérias e de actinomicetos em vasos de cultivo com *Panicum maximum* mais inóculo de diferentes espécies de fungos MA e relataram que as populações de bactérias em geral foram maiores em plantas colonizadas com *Glomus fasciculatum*; *Gigaspora margarita* e *Sclerocystis dusii* do que em plantas não micorrizadas. Outras populações microbianas incluindo bactérias fixadoras de nitrogênio, actinomicetos, grupos morfológicos e fisiológicos de bactérias (gram +/-, formadoras de esporos, bactérias capazes de hidrolisar uréia e bactérias capazes de hidrolisar amido) variaram com a espécie de fungo MA. Além disso, bactérias com capacidade de hidrolisar uréia estiveram presentes na rizosfera de todas as plantas endomicorrizadas, mas ausentes nas não micorrizadas. Assim, parece que, os diferentes fungos micorrízicos arbusculares exercem um efeito seletivo (estimulação ou redução) sobre a flora bacteriana da rizosfera. Estes autores, ainda realizaram um teste de atividade antagonística dos isolados de actinomicetos a alguns fitopatógenos e observaram um possível mecanismo de controle de fitopatologias via micorriza arbuscular, através da estimulação diferenciada dos fungos micorrízicos arbusculares a esses actinomicetos antagonistas rizosféricos.

## **2. 7. ESTÍMULOS À FORMAÇÃO DE MICORRIZAS ARBUSCULARES (MA)**

O estabelecimento da simbiose micorrízica arbuscular pode ser influenciado pela comunidade microbiana na rizosfera. Vários aspectos são observados nesses estudos, tais como: colonização da raiz, (aspecto mais frequentemente observado); germinação de esporos; crescimento do micélio no solo; estimulação e afinidade da hifa infectiva pela raiz; penetração da raiz, estabelecimento da biotrofia e expansão do micélio secundário dentro e fora da raiz (LINDERMAN, 1992).

Ames (1989) demonstrou pela primeira vez o efeito benéfico de actinomicetos isolados de esporos de FMA (*Glomus macrocarpum*), sobre o desenvolvimento de MA e crescimento de cebola em um sistema de solo não esterilizado e sugeriu que actinomicetos isolados de esporos de FMA, podem não ser os micro-organismos primários responsáveis pela redução da população de esporos de FMA e sua efetividade em solos não esterilizados.

Vários autores têm observado que a presença de actinomicetos contaminantes ou coinoculados com fungos micorrízicos arbusculares aumenta a taxa de germinação desses micro-organismos. Mugnier e Mosse (1987) observaram que os esporos de *Glomus mosseae* somente germinavam quando se desenvolvia contaminantes no meio ágar. Tylka; Hussey e Roncadori (1991) evidenciaram que compostos voláteis de *Streptomyces orientalis* em meio ágar/água estimulavam a germinação de esporos de *Glomus mosseae* e *Gigaspora margarita*, mas não de *Scutellospora heterogama*.

Alguns dos poucos compostos produzidos pelos actinomicetos são bem conhecidos devido ao seu odor. Dois compostos orgânicos voláteis de relativa abundância e ubiquidade no solo são geosmin e 2-metilsoborneol (MIB) (SIQUEIRA; BREAKLEY; HUBELL, 1985).

Carpenter-Boggs; Loynachan e Stahl (1995) demonstraram uma correlação positiva entre o aumento da taxa de germinação de esporos de *G. margarita* e a quantidade de compostos voláteis produzidos por actinomicetos isolados de solo, sugerindo a importância ecológica de uma tríplice interação mutualística envolvendo esporos de fungos MA, actinomicetos e plantas hospedeiras através da seguinte hipótese: a estimulação da germinação dos esporos de fungos MA aumenta a probabilidade de formação da associação micorrízica na rizosfera dos fitossimbiontes; por outro lado, o micélio extra radicular do fungo pode servir como um importante substrato energético para os actinomicetos quitinolíticos. Assim, a produção inicial dos compostos voláteis pode em troca ser estimulada pela proximidade dos actinomicetos a fonte de energia na rizosfera da planta ou algum outro sinal rizosférico.

## 2. 8. INIBIÇÃO À FORMAÇÃO DE MICORRIZAS ARBUSCULARES (MA)

Actinomicetos do solo podem ser também antagonistas (inibidores) aos fungos micorrízicos arbusculares de modo que esporos quiescentes desses fungos podem germinar em alguns solos, mas não em outros. Tommerup (1983) mostrou que se solos inibitórios fossem pasteurizados, os esporos de fungos MA aí adicionados germinavam, indicando a participação de micro-organismos na inibição da germinação de esporos.

Krishna; Balakrishna e Bagyaraj (1982) noticiaram a respeito de uma interação antagônica entre *Streptomyces cinnamomeous* e *Glomus fasciculatum*. O antagonismo se deu quando se inoculou os dois micro-organismos simultaneamente e quando se inoculou os dois em tempo diferente: *Streptomyces* reduziu a produção de esporos e o desenvolvimento da infecção por *Glomus*; enquanto que *Glomus* reduziu a multiplicação de *Streptomyces*. Essa interação negativa entre esses micro-organismos influenciou de forma negativa o desenvolvimento da planta hospedeira.

Siqueira; Breakley e Hubell (1985), em experimento *in vitro*, reportaram acerca da inibição da taxa de germinação de esporos de FMA (*Gigaspora margarita* e *Glomus mosseae*) na presença de compostos voláteis produzidos por actinomicetos (*Streptomyces* e *Actinomyces*) isolados do solo. Documentaram uma taxa de inibição de germinação maior (em torno de 90%) para *G. margarita* e relacionaram hipoteticamente a maior tolerância de *G. mosseae* a estes fatores inibitórios ao fato de que esta espécie ocorre com maior frequência em solos neutros e alcalinos onde os actinomicetos proliferam com maior intensidade.

Pereira et al. (1991), em experimento de casa de vegetação, revelaram que a colonização micorrízica em soja, com o FMA *Glomus etunicatum*, foi completamente inibida na presença do isolado de actinomiceto ACT-78, originário de solo sob cerrado da região de Planaltina.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo que constou de três experimentos, conforme descritos abaixo, foi realizado em casa de vegetação, no Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB/EMBRAPA), Seropédica-RJ, com 22°46' de latitude sul e 43°41' de longitude oeste, com altitude de 33 metros. O clima é AW segundo Köppen. Utilizaram-se também os Laboratórios de Ecologia Microbiana e de Micorrizas do CNPAB/EMBRAPA e o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

#### 3.1. Experimento I: Interação entre actinomicetos e rizóbio na rizosfera de soja

Este experimento foi conduzido, utilizando-se vasos “Leonard” contendo vermiculita e areia na proporção de 2:1, esterilizados em autoclave por duas horas, a 121° C e 1,5 atm. A solução nutritiva utilizada nos vasos de Leonard foi uma modificação da solução de Norris, de acordo com Gruzman e Döbereiner (1968).

As sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) cv. Seridó foram desinfestadas superficialmente em álcool 96° por 30 segundos e em peróxido de hidrogênio (10%) (ANDRADE; HAMAKAWA, 1994) por 3 minutos com sete lavagens consecutivas em água destilada esterilizada e, então submetidas à inoculação microbiana.

Foram utilizados como inóculos, dois isolados de actinomicetos (ACT-78 e ACT-370), identificados como pertencentes ao gênero *Streptomyces* spp., estirpe BR 29 de *Bradyrhizobium elkanii* e estirpe BR 33 de *Bradyrhizobium japonicum*, obtidos da coleção de culturas do CNPAB/EMBRAPA.

O inóculo das estirpes de rizóbio crescido em meio de cultura líquido – meio YM ou meio 79, descrito por Vincent (1970), contendo ( $10^8$  Unidades Formadoras de Colônias/mL) foi misturado em turfa esterilizada, bem como o inóculo de actinomicetos preparado a partir de colônias crescidas em meio amido-NO<sub>3</sub> (WAKSMAN, 1961), obtendo-se uma suspensão de inóculo contendo aproximadamente  $10^8$  UFC/mL.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições e constou de 11 tratamentos: (1) ACT-78 + N<sub>2</sub>; (2) ACT-370 + N<sub>2</sub>; (3) BR 29; (4) BR 33; (5) ACT-78 + BR29; (6) ACT-78 + BR33; (7) ACT-78 + (BR29 + BR33); (8) ACT-370 + BR29; (9) ACT-370 + BR33; (10) ACT-370 + (BR29 + BR33) e (11) testemunha – N<sub>2</sub>.

Após 61 dias da semeadura as plantas foram colhidas para as avaliações de: biomassa de raiz seca (BRS) e de parte aérea seca (BPAS); número de nódulos (NNOD) e biomassa de nódulos secos (BNS), colonização rizosférica pelos isolados de actinomicetos através de diluições seriadas ou densidade de actinomicetos na rizosfera de soja (DARS).

### 3.2. Experimento II: Interação entre actinomicetos, rizóbio e fungos micorrízicos-arbusculares (FMA) na rizosfera de soja

Neste experimento, utilizaram-se vasos de 1 Kg, sendo o substrato constituído de um solo, série Itaguaí de textura arenosa, autoclavado por duas vezes, a 121°C e 1.5 atm, misturado com areia de rio na proporção de 1:1 (v:v) e distribuído no vaso da seguinte maneira (uma primeira camada de 700 g do solo autoclavado no fundo do vaso; uma segunda camada de 100 g correspondente ao inóculo misto de FMA (solo, raízes, hifas e esporos); e uma terceira camada de 200 g de solo autoclavado. O inóculo de FMA foi incubado durante uma semana.

A análise do solo apresentou as seguintes características (Tabela 1).

**Tabela 1** – Características químicas e físicas do solo

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS							
pH (H <sub>2</sub> O)	P (mg/dm <sup>3</sup> )	K (cmol <sub>e</sub> /dm <sup>3</sup> )	Ca + Mg (cmol <sub>e</sub> /dm <sup>3</sup> )	Al (cmol <sub>e</sub> /dm <sup>3</sup> )	C %	N %	M.O. %
5,1	3	37	2,8	0,2	0,12	0,027	0,21
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS							
Análise granulométrica							
AREIA FINA %	AREIA GROSSA %	AREIA TOTAL %	ARGILA %	SILTE %			
2	61	63	12	25			
Umidade equivalente (%) = 13		-	Mistura 3:1 = 11				

Tanto a adubação fosfatada quanto a correção de pH foram realizadas para um volume de 160 Kg de solo com 32 g de superfosfato simples e 80 g de óxido de cálcio, respectivamente. Foi adicionado 6 g de potássio na forma de  $K_2SO_4$  e uma solução nutritiva de micronutrientes e Mg (FRANCO; DÖBEREINER, 1967) foi adicionada semanalmente na água de irrigação.

Foram utilizados como inóculos, dois isolados de actinomicetos (ACT-78 e ACT-370), identificados como *Streptomyces* spp.; duas estirpes de *Bradyrhizobium* (BR 29 de *Bradyrhizobium elkanii* e BR 33 de *Bradyrhizobium japonicum*), e duas espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA): *Gigaspora margarita* e *Glomus clarum*, obtidos da coleção de culturas do CNPAB/EMBRAPA. O inóculo das estirpes de *Bradyrhizobium* foi crescido em meio de cultura líquido descrito por Vincent, 1970 ( $10^8$  Unidades Formadoras de Colônias/mL) e o inóculo de actinomicetos foi preparado a partir de colônias crescidas em meio amido- $NO_3$  (WAKSMAN, 1961), obtendo-se uma suspensão de inóculo contendo aproximadamente  $10^8$  UFC/mL.

O inóculo misto das espécies de FMA foi multiplicado em vasos de cultivo com *Brachiaria decumbens*, contendo aproximadamente 144 esporos por  $50\text{ cm}^3$  para *Glomus clarum* e aproximadamente 266 esporos por  $50\text{ cm}^3$  para *Gigaspora margarita*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com os tratamentos constituindo um esquema fatorial ( $3 \times 3 \times 3$ ) com cinco repetições, totalizando 135 observações. O arranjo experimental tem os seguintes fatores:

**FATOR 1:** Tratamentos com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA):

*Gigaspora Margarita*  
*Glomus Clarum*  
*Sem o inóculo fúngico*

**FATOR 2:** Tratamentos com Rizóbio:

*Somente B. elkanii*  
*Somente B. japonicum*  
*Misto (B. japonicum + B. elkanii)*

**FATOR 3:** Tratamentos com Actinomicetos:

*Isolado ACT – 78*  
*Isolado ACT – 370*  
*Sem Actinomicetos*

As sementes de soja foram desinfestadas em álcool 96° GL por trinta segundos e em peróxido de hidrogênio (10%) por três minutos e sete lavagens consecutivas com água destilada esterilizada.

A coleta do experimento foi realizada aos setenta e quatro dias após a sua montagem, época de iniciação da floração da soja, e as variáveis avaliadas foram as seguintes: **BPAS**: (Biomassa de Parte Aérea Seca – g/planta); **BRS**: (Biomassa de Raiz Seca – g/planta); **BPAS/BRS**: (Relação ou razão entre BPAS/BRS); **NNOD**: (Número de Nódulos); **BNS**: (Biomassa de Nódulos Secos – mg/planta); **PPAS**: [Teor de Fósforo na parte aérea seca da planta (g/Kg)]; **PRAIZ**: [Teor de Fósforo na raiz seca da planta (g/Kg)]; **PTOTAL**: [(Teor de Fósforo total da planta (g/Kg)]; **KPAS**: [Teor de Potássio na parte aérea seca da planta (g/Kg)]; **KRAIZ**: [Teor de Potássio na raiz seca da planta (g/Kg)]; **KTOTAL**: [Teor de Potássio total da planta (g/Kg)]; **CaPAS**: [Teor de Cálcio na parte aérea seca da planta (g/Kg)]; **CaRAIZ**: [Teor de Cálcio na raiz seca da planta (g/Kg)]; **CaTOTAL**: [Teor de Cálcio total da planta (g/Kg)]; **MgPAS**: [Teor de Magnésio na parte aérea seca da planta (g/Kg)]; **MgRAIZ**: [Teor de Magnésio na raiz seca da planta (g/Kg)]; **MgTOTAL**: [Teor de Magnésio total da planta (g/Kg)]; **DARS**: (Densidade de Actinomicetos na Rizosfera de Soja).

A densidade das populações de actinomicetos em geral na micorrizosfera foi avaliada pelo método de diluições e contagens em placas. Utilizou-se para plaqueamento as diluições  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$ , com três repetições cada. Para efeito de avaliação foi considerado a diluição  $10^4$ .

A densidade das populações de actinomicetos foi expressa pelo número de unidades formadoras de colônias (UFC/g de raiz seca), obtido após a secagem das raízes em estufa de circulação forçada a 65° C até alcançar peso constante.

O método utilizado para avaliação dos teores de nutrientes (P, K, Ca e Mg) na parte aérea e na raiz das plantas de soja, foi baseado em Bataglia et al. (1983).

A apresentação dos resultados se dará, em um primeiro momento, de modo descritivo tomando como base a análise descritiva e exploratória dos dados e num segundo momento, tomando como base a técnica de Análise de

variância – ANOVA – far-se-á a comparação dos efeitos dos fatores estudados e suas interações.

### **3.3. Experimento III: Interação entre FMA, actinomicetos e rizóbio em um delineamento inteiramente casualizado na rizosfera de soja**

Esse experimento utilizou-se das mesmas condições do segundo experimento, valendo ressaltar suas especificidades, quais sejam: tem um delineamento experimental inteiramente casualizado, com 3 tratamentos, com cinco repetições, totalizando 15 unidades experimentais ou parcelas. Os tratamentos foram os seguintes: 2 tratamentos com fungos micorrízicos arbusculares (inoculação com *Glomus clarum* e inoculação com *Gigaspora margarita*) e 1 testemunha sem o inóculo fúngico; 3 tratamentos com rizóbio (inoculação de *B. japonicum* + *B. elkanii*; inoculação com *B. japonicum* sozinho e inoculação com *B. elkanii* sozinho); 2 tratamentos com actinomicetos (inoculação com o isolado ACT - 78 e inoculação com o isolado ACT- 370) e 1 testemunha sem actinomicetos.

As variáveis avaliadas no proceder da coleta do experimento (época de floração da soja) foram às mesmas do experimento II, com exceção para o número de nódulos e para a biomassa de nódulos secos.

### **3.4. Análise estatística dos dados**

Os dados do experimento I e III foram submetidos à análise de variância, segundo o delineamento inteiramente casualizado, e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey (1977), a 5% de probabilidade. No experimento I, utilizou-se o MINITAB STATISTICAL SOFTWARE (MSTAT) e também se utilizou a abordagem dos contrastes ortogonais. No experimento II, a análise realizada foi para experimento em fatorial com delineamento inteiramente casualizado. Nos experimentos II e III utilizou-se como ferramenta auxiliar nas análises o "PASW® Statistics 18 Core System" ou como é conhecido SPSS.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Experimento I

Os dois isolados de actinomicetos estudados (ACT-78 e ACT-370) colonizaram a rizosfera de soja e foram recuperados numa densidade de  $10^4$  UFC/g de raiz sem nenhuma diferença significativa entre os tratamentos, evidenciando tanto a colonização quanto o estabelecimento na rizosfera de soja. No período estudado, não houve resposta significativa quanto à biomassa de raiz seca e a biomassa de parte aérea seca das plantas em resposta à coinoculação de isolados de actinomicetos e de estirpes de *Bradyrhizobium* spp (Tabela 2).

A coinoculação dos isolados de actinomicetos influenciou a nodulação da soja através de variações dos números de nódulos, de modo a indicar tanto uma influência antibiótica quanto uma influência probiótica dos isolados de actinomicetos sobre as estirpes de *Bradyrhizobium* spp. estudadas influenciando no peso unitário do nódulo seco (Figura 1, Tabelas 3 e 4). O isolado de actinomiceto ACT-78 promoveu uma maior nodulação quando coinoculado com a estirpe BR33, mas reduziu significativamente a nodulação da estirpe BR29, enquanto que o isolado ACT-370 proporcionou uma maior nodulação junto a BR29 e diminuiu a nodulação da BR33.

Entre os fatores bióticos que podem modificar os padrões competitivos das estirpes de *Bradyrhizobium* spp. estão às populações de actinomicetos na comunidade bacteriana dos solos tropicais, visto que são conhecidos como produtores de antibióticos (GOTTLIEB, 1973; COELHO; DROZDOWICZ, 1978), podendo por isso, desenvolver amensalismo ou antagonismo em relação a outros micro-organismos, entre eles os rizóbios que fazem a fixação biológica de nitrogênio de modo simbiótico, afetando o comportamento e a fisiologia destes.

Pereira; Neves; Drozdowicz (1999) constataram que inoculações simples e em mistura de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. na presença de actinomicetos influenciaram significativamente o peso de nódulos secos, porém as diferenças observadas em número de nódulos não foram significativas.

É interessante destacar que a inoculação simultânea da BR 29 com o isolado ACT-370, considerado antagônico a esta (PEREIRA, 1995; PEREIRA; NEVES; DROZDOWICZ, 1999), teve um comportamento diferente, ou seja, foi probiótico, onde o número de nódulos nessas plantas foi maior, enquanto que o isolado ACT-78 foi antagônico a BR 29 nessa variável. O efeito contrário constatou-se para a estirpe BR 33.

Embora tenha havido essa relação quanto ao número de nódulos, para a biomassa de nódulo seco (valor unitário), percebe-se uma tendência do isolado ACT-78 influenciar o peso unitário maior de nódulo para as plantas que receberam BR-29 e o ACT-370, influenciando mais a estirpe BR-33.

**Tabela 2** – Densidade de actinomicetos da rizosfera de soja (UFC/g de raiz), biomassa de raiz seca (BRS) e biomassa de parte aérea seca (BPAS) de soja cv. Seridó, em vasos Leonard, em resposta à coinoculação com isolados de actinomicetos e de *Bradyrhizobium* spp. Médias de três repetições.

TRATAMENTOS	ACTINOMICETOS (UFC/g de raiz) *	BRS (mg/planta)*	BPAS (mg/planta)*
ACT-370+N	5,13 x 10 <sup>4</sup>	336	1603
ACT-78+N	5,2 x 10 <sup>4</sup>	294	1695
ACT-370+(BR29+BR33)	5,17 x 10 <sup>4</sup>	289	2056
ACT-78+(BR29+BR33)	4,77 x 10 <sup>4</sup>	228	1682
ACT-370+BR29	5,17 x 10 <sup>4</sup>	318	2308
ACT-370+BR33	5,13 x 10 <sup>4</sup>	269	1917
ACT-78+BR29	5,0 x 10 <sup>4</sup>	277	1376
ACT-78+BR33	4,94 x 10 <sup>4</sup>	326	2010
BR33		349	2400
BR29		399	2370

\*-Não houve diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos nas variáveis analisadas.

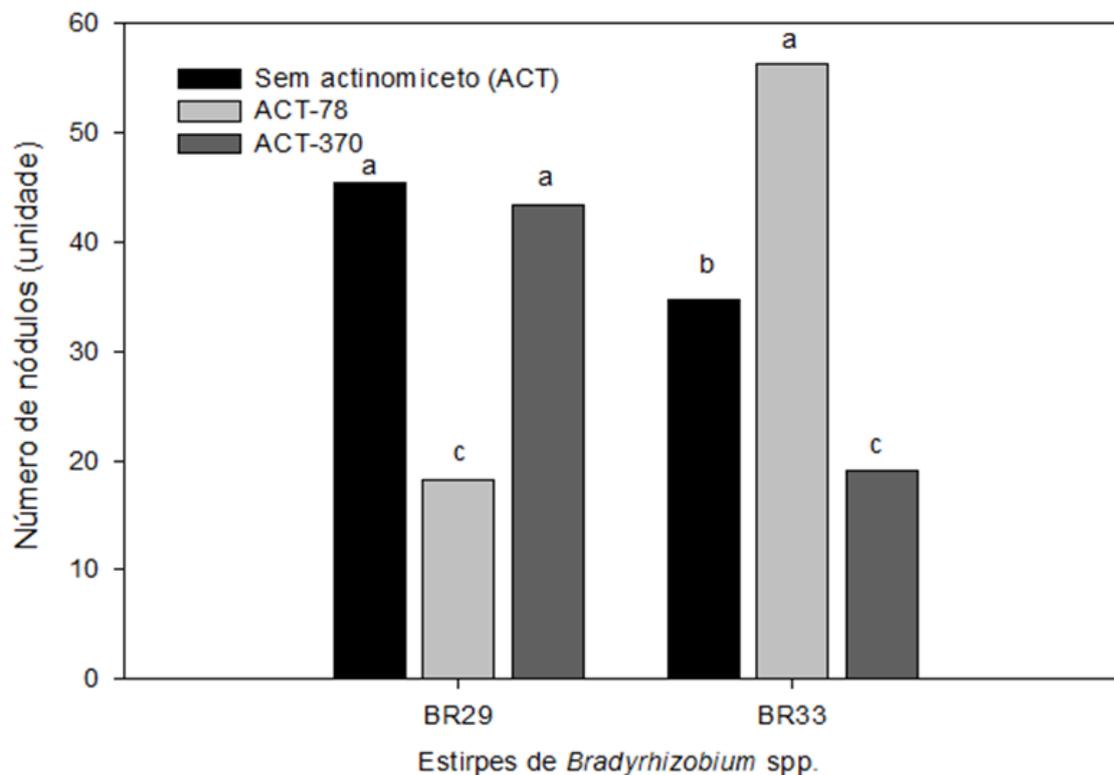


Figura 1 - Número de nódulos de soja em presença de dois isolados de actinomicetos (*Streptomyces* spp) e duas estirpes de *Bradyrhizobium* spp. Médias de três repetições. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey, para as interações entre actinomicetos e estirpes de rizóbio analisadas.

Tabela 3 – Peso unitário de nódulos secos (mg) de soja cv. Seridó, em vasos Leonard, em resposta à coinoculação de isolados de actinomicetos e *Bradyrhizobium* spp.

Tratamentos	Peso unitário de nódulos secos (mg)
BR 29	8,0
BR 29 + ACT 78	10,0
BR 29 + ACT 370	4,9
BR 33	4,3
BR 33 + ACT 78	3,1
BR 33 + ACT 370	6,7

**Tabela 4** – Comparação por contrastes ortogonais do efeito da coinoculação de isolados de actinomicetos e *Bradyrhizobium* spp, no peso unitário de nódulos secos (mg) de soja cv. Seridó em vasos Leonard.

Contrastes ortogonais	Nível de significância (Teste F)
(BR 29 + ACT 78) x BR 29	80 %
(BR 29 + ACT 370) x BR 29	20 %
(BR 33 + ACT 78) x BR 33	30 %
(BR 33 + ACT 370) x BR 33	01%

## 4.2. EXPERIMENTO II

A apresentação dos resultados será feita de acordo com as análises realizadas, ou seja, em primeiro lugar será apresentada os resultados da análise descritiva e exploratória e depois os resultados da análise de variância.

### 4.2.1 Resultados da análise descritiva e exploratória

As Tabelas 5, 6, 7 apresentam os valores do tamanho da amostra, da média e desvio padrão para as variáveis medidas por cada um dos fatores definidos para o experimento II.

De acordo com a Tabela 5, analisando os resultados para o fator 1 (FMA), percebe-se que a presença das espécies de fungos micorrízicos *G. margarita* e *G. clarum* influenciou de modo expressivo as seguintes variáveis: biomassa de parte aérea seca (BPAS), biomassa de raiz seca (BRS), relação entre BPAS/BRS, número de nódulos (NOD), biomassa de nódulos secos (BNS), teores de fósforo na parte aérea (PPAS), na raiz (PRAIZ), e teores de fósforo total (PTOTAL) e densidade de actinomicetos na rizosfera de soja (DARS) que apresentaram valores maiores do que as plantas sem o inóculo fúngico. Entre essas variáveis destacadas, vale ressaltar que houve ainda uma diferença entre os isolados de FMA, ou seja, para BNS o isolado de *G. clarum*

proporcionou um valor médio maior (0,17) do que *G. margarita* que contribuiu para um valor médio de biomassa de nódulos secos (= 0,14). Este mesmo comportamento foi observado para todas as variáveis de teores de fósforo nas plantas (PPAS, PRAIZ, PTOTAL), isto é, o FMA *Glomus clarum* influenciou de modo significativo esses teores de P nas plantas em relação ao FMA *G. margarita*.

**Tabela 5:** Estatísticas descritivas para as variáveis de entrada do estudo, segundo os tratamentos do Fator 1 do experimento 2.

Variáveis	Tratamentos com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA)									Total			Comparação dos Tratamentos (Valor-p)
	<i>Gigaspora margarita</i>			<i>Glomus clarum</i>			Sem o inóculo fúngico						
	n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP	
BPAS (g/planta)	45	2,89 <sup>B</sup>	0,55	45	2,79 <sup>B</sup>	0,73	45	0,57 <sup>A</sup>	0,39	135	2,14	1,20	0,0000 <sup>(*)</sup>
BRS (g/planta)	45	0,53 <sup>B</sup>	0,11	45	0,54 <sup>B</sup>	0,18	45	0,18 <sup>A</sup>	0,12	135	0,43	0,21	0,0000 <sup>(*)</sup>
BPAS/BRS	45	5,58 <sup>B</sup>	1,41	45	5,59 <sup>B</sup>	1,77	45	3,36 <sup>A</sup>	1,11	135	4,90	1,78	0,0000 <sup>(*)</sup>
NNOD	45	29,60 <sup>B</sup>	11,95	45	27,29 <sup>B</sup>	11,34	45	11,08 <sup>A</sup>	11,18	135	23,10	14,00	0,0000 <sup>(*)</sup>
BNS (g/planta)	45	0,14 <sup>B</sup>	0,04	45	0,17 <sup>C</sup>	0,05	45	0,02 <sup>A</sup>	0,01	135	0,11	0,08	0,0000 <sup>(*)</sup>
Fósforo na Parte Aérea (g/Kg)	45	0,69 <sup>A</sup>	0,13	45	0,85 <sup>B</sup>	0,16	45	0,72 <sup>A</sup>	0,26	135	0,75	0,20	0,0002 <sup>(*)</sup>
Fósforo na Raiz (g/Kg)	45	0,92 <sup>B</sup>	0,11	45	1,00 <sup>C</sup>	0,15	45	0,60 <sup>A</sup>	0,18	135	0,85	0,22	0,0000 <sup>(*)</sup>
Fósforo Total (g/Kg)	45	1,61 <sup>B</sup>	0,19	45	1,85 <sup>C</sup>	0,21	45	1,32 <sup>A</sup>	0,31	135	1,60	0,32	0,0000 <sup>(*)</sup>
Potássio na Parte Aérea (g/Kg)	45	13,84 <sup>A</sup>	1,52	45	13,77 <sup>A</sup>	1,63	45	18,71 <sup>B</sup>	2,43	135	15,32	2,94	0,0000 <sup>(*)</sup>
Potássio na Raiz (g/Kg)	45	15,04 <sup>A</sup>	4,22	45	12,70 <sup>A</sup>	2,51	45	29,28 <sup>B</sup>	10,29	135	18,61	9,60	0,0000 <sup>(*)</sup>
Potássio Total (g/Kg)	45	28,88 <sup>A</sup>	4,85	45	26,47 <sup>A</sup>	3,58	45	47,98 <sup>B</sup>	10,49	135	33,92	11,63	0,0000 <sup>(*)</sup>
Cálcio na Parte Aérea (g/Kg)	45	7,14 <sup>A</sup>	1,13	45	8,17 <sup>B</sup>	1,17	45	9,90 <sup>C</sup>	1,70	135	8,35	1,75	0,0000 <sup>(*)</sup>
Cálcio na Raiz (g/Kg)	45	5,92 <sup>B</sup>	1,39	45	5,68 <sup>B</sup>	1,47	45	4,78 <sup>A</sup>	1,33	135	5,49	1,47	0,0007 <sup>(*)</sup>
Cálcio Total (g/Kg)	45	13,06 <sup>A</sup>	1,92	45	13,67 <sup>A,B</sup>	2,08	45	14,68 <sup>B</sup>	2,09	135	13,77	2,12	0,0015 <sup>(*)</sup>
Magnésio na Parte Aérea (g/Kg)	45	4,13 <sup>A</sup>	0,42	45	4,27 <sup>A</sup>	0,43	45	5,63 <sup>B</sup>	0,62	135	4,64	0,82	0,0000 <sup>(*)</sup>
Magnésio na Raiz (g/Kg)	45	9,90 <sup>A</sup>	1,91	45	10,19 <sup>A</sup>	2,30	45	9,16 <sup>A</sup>	2,09	135	9,78	2,13	0,0747
Magnésio Total (g/Kg)	45	14,04 <sup>A</sup>	1,99	45	14,46 <sup>A</sup>	2,35	45	14,79 <sup>A</sup>	2,12	135	14,42	2,16	0,2753
DARS <sup>1</sup>	45	2,696 <sup>B</sup>	18,40	45	2,926 <sup>B</sup>	23,02	45	0,744 <sup>A</sup>	12,24	135	22,32	20,91	0,0000 <sup>(*)</sup>

<sup>(\*)</sup> Teste (ANOVA) significativo ao nível de 5%; (1) a densidade de actinomicetos é expressa em UFC/g raiz = UFC x 10<sup>5</sup>. Então, tem-se (2,7 x 10<sup>5</sup>; 2,92 x 10<sup>5</sup> e 0,74 x 10<sup>5</sup>, respectivamente), para os valores médios da variável DARS na última linha da Tabela. Médias seguidas com letras diferentes na coluna são significativamente diferentes.

Para os teores de potássio (KPAS, KRAIZ, KTOTAL), houve diferenças significativas entre os valores médios dos tratamentos onde as plantas que não foram inoculadas com nenhum isolado de FMA, apresentaram teores médios maiores de K em relação às plantas que foram inoculadas. Como visto, considerando apenas o fator 1, a inoculação dos isolados de FMA *G. margarita* e *G. clarum* não influenciou os teores de K em plantas de soja. Para os teores de Cálcio, observou-se o seguinte: para teores de CaPAS, constataram-se diferenças entre todos os tratamentos; para os teores de CaRAIZ, houveram diferenças entre os tratamentos que receberam os isolados fúngicos em relação as plantas sem esse tipo de inóculo; e para os teores de CaTOTAL houveram diferenças entre os tratamentos que receberam *G. margarita* em relação as plantas que não foram inoculadas com FMA, sendo que o teor médio das plantas que foram inoculadas com *G. clarum* não diferiu de modo significativo com o tratamento que não recebeu o inóculo fúngico. Para os teores de magnésio (MgRAIZ e MgTOTAL) não houve diferença nenhuma entre os tratamentos.

De acordo com a Tabela 6 com a análise para o fator 2 (rizóbio) e a Tabela 7 com a análise para o fator 3 (actinomicetos), constatou-se que houve apenas influência para a variável número de nódulos (NNOD), respectivamente. Assim, em função do fator 2, quando as plantas receberam o inóculo contendo somente *B. elkanii* (BR 29), apresentaram um número médio maior de nódulos em relação às plantas que receberam apenas *B. japonicum* (BR 33). Com relação ao fator 3, constatou-se que o isolado ACT-370, foi o que mais influenciou o número de nódulos em relação aos demais tratamentos.

**Tabela 6** - Estatísticas descritivas para as variáveis de entrada do estudo, segundo os tratamentos do Fator 2 do experimento 2.

Variáveis	Tratamentos com Rizóbio											Comparação dos Tratamentos (Valor-p)	
	Somente <i>B. elkanii</i>			Somente <i>B. japonicum</i>			Misto ( <i>B. japonicum</i> + <i>B. elkanii</i> )			N	Média		DP
	n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP				
BPAS (g/planta)	45	2,14 <sup>A</sup>	1,14	45	2,20 <sup>A</sup>	1,31	45	2,08 <sup>A</sup>	1,17	135	2,14	1,20	0,8960
BRS (g/planta)	45	0,44 <sup>A</sup>	0,23	45	0,40 <sup>A</sup>	0,20	45	0,44 <sup>A</sup>	0,21	135	0,43	0,21	0,6034
BPAS/BRS	45	4,73 <sup>A</sup>	1,52	45	5,39 <sup>A</sup>	2,14	45	4,60 <sup>A</sup>	1,56	135	4,90	1,78	0,0855
NNOD	45	27,05 <sup>B</sup>	11,54	45	16,35 <sup>A</sup>	12,54	45	25,87 <sup>B</sup>	15,27	135	23,10	14,00	0,0004 <sup>(*)</sup>
BNS (g/planta)	45	0,13 <sup>A</sup>	0,08	45	0,10 <sup>A</sup>	0,07	45	0,12 <sup>A</sup>	0,08	135	0,11	0,08	0,1572
Fósforo na Parte Aérea (g/Kg)	45	0,74 <sup>A</sup>	0,20	45	0,79 <sup>A</sup>	0,18	45	0,73 <sup>A</sup>	0,23	135	0,75	0,20	0,3134
Fósforo na Raiz (g/Kg)	45	0,84 <sup>A</sup>	0,20	45	0,83 <sup>A</sup>	0,21	45	0,88 <sup>A</sup>	0,26	135	0,85	0,22	0,6210
Fósforo Total (g/Kg)	45	1,58 <sup>A</sup>	0,30	45	1,62 <sup>A</sup>	0,30	45	1,61 <sup>A</sup>	0,36	135	1,60	0,32	0,8641
Potássio na Parte Aérea (g/Kg)	45	15,42 <sup>A</sup>	3,59	45	15,42 <sup>A</sup>	2,48	45	15,12 <sup>A</sup>	2,72	135	15,32	2,94	0,8632
Potássio na Raiz (g/Kg)	45	19,64 <sup>A</sup>	10,80	45	18,92 <sup>A</sup>	9,10	45	17,34 <sup>A</sup>	8,93	135	18,61	9,60	0,5212
Potássio Total (g/Kg)	45	35,06 <sup>A</sup>	13,78	45	34,34 <sup>A</sup>	11,00	45	32,46 <sup>A</sup>	10,02	135	33,92	11,63	0,5618
Cálcio na Parte Aérea (g/Kg)	45	8,49 <sup>A</sup>	1,75	45	8,25 <sup>A</sup>	1,52	45	8,31 <sup>A</sup>	1,96	135	8,35	1,75	0,8020
Cálcio na Raiz (g/Kg)	45	5,68 <sup>A</sup>	1,31	45	5,49 <sup>A</sup>	1,67	45	5,30 <sup>A</sup>	1,41	135	5,49	1,47	0,4833
Cálcio Total (g/Kg)	45	13,98 <sup>A</sup>	2,23	45	13,74 <sup>A</sup>	2,04	45	13,61 <sup>A</sup>	2,12	135	13,77	2,12	0,7122
Magnésio na Parte Aérea (g/Kg)	45	4,67 <sup>A</sup>	0,75	45	4,61 <sup>A</sup>	0,78	45	4,64 <sup>A</sup>	0,94	135	4,64	0,82	0,9561
Magnésio na Raiz (g/Kg)	45	9,55 <sup>A</sup>	2,22	45	9,73 <sup>A</sup>	1,98	45	10,02 <sup>A</sup>	2,21	135	9,78	2,13	0,5851
Magnésio Total (g/Kg)	45	14,22 <sup>A</sup>	2,55	45	14,35 <sup>A</sup>	1,79	45	14,66 <sup>A</sup>	2,12	135	14,42	2,16	0,6178
DARS <sup>1</sup>	45	2,256 <sup>A</sup>	18,62	45	1,767 <sup>A</sup>	16,94	45	2,633 <sup>A</sup>	25,32	135	22,32	20,91	0,1650

<sup>(\*)</sup> Teste (ANOVA) significativo ao nível de 5%; (1) a densidade de actinomicetos é expressa em UFC/g raiz = UFC x 10<sup>5</sup>. Então, tem-se (2,25 x 10<sup>5</sup>; 1,76 x 10<sup>5</sup> e 2,63 x 10<sup>5</sup>, respectivamente), para os valores médios da variável DARS na última linha da Tabela. Médias seguidas com letras diferentes na coluna são significativamente diferentes.

Tabela 7 - Estatísticas descritivas para as variáveis de entrada do estudo, segundo os tratamentos do Fator 3 do experimento 2.

Variáveis	Tratamentos com Actinomicetos									Total		Comparação dos Tratamentos (Valor-p)	
	Isolado ACT – 78			Isolado ACT- 370			Sem Actinomicetos						
	n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média		DP
BPAS (g/planta)	45	2,13 <sup>A</sup>	1,19	45	2,10 <sup>A</sup>	1,15	45	2,19 <sup>A</sup>	1,29	135	2,14	1,20	0,9384
BRS (g/planta)	45	0,42 <sup>A</sup>	0,20	45	0,44 <sup>A</sup>	0,20	45	0,41 <sup>A</sup>	0,24	135	0,43	0,21	0,7868
BPAS/BRS	45	4,94 <sup>A</sup>	1,90	45	4,52 <sup>A</sup>	1,21	45	5,27 <sup>A</sup>	2,09	135	4,90	1,78	0,1464
NNOD	45	19,98 <sup>A</sup>	12,87	45	29,09 <sup>B</sup>	12,47	45	20,10 <sup>A</sup>	14,89	135	23,10	14,00	0,0018 <sup>(*)</sup>
BNS (g/planta)	45	0,11 <sup>A</sup>	0,07	45	0,12 <sup>A</sup>	0,08	45	0,11 <sup>A</sup>	0,07	135	0,11	0,08	0,4566
Fósforo na Parte Aérea (g/Kg)	45	0,74 <sup>A</sup>	0,23	45	0,75 <sup>A</sup>	0,16	45	0,77 <sup>A</sup>	0,22	135	0,75	0,20	0,7126
Fósforo na Raiz (g/Kg)	45	0,86 <sup>A</sup>	0,19	45	0,84 <sup>A</sup>	0,24	45	0,86 <sup>A</sup>	0,25	135	0,85	0,22	0,9220
Fósforo Total (g/Kg)	45	1,59 <sup>A</sup>	0,31	45	1,59 <sup>A</sup>	0,33	45	1,63 <sup>A</sup>	0,34	135	1,60	0,32	0,8224
Potássio na Parte Aérea (g/Kg)	45	14,64 <sup>A</sup>	2,42	45	15,70 <sup>A</sup>	2,54	45	15,62 <sup>A</sup>	3,67	135	15,32	2,94	0,1718
Potássio na Raiz (g/Kg)	45	18,35 <sup>A</sup>	9,30	45	20,36 <sup>A</sup>	10,24	45	17,05 <sup>A</sup>	9,13	135	18,61	9,60	0,2738
Potássio Total (g/Kg)	45	32,99 <sup>A</sup>	10,93	45	36,06 <sup>A</sup>	12,24	45	32,67 <sup>A</sup>	11,64	135	33,92	11,63	0,3246
Cálcio na Parte Aérea (g/Kg)	45	8,46 <sup>A</sup>	2,16	45	8,18 <sup>A</sup>	1,22	45	8,40 <sup>A</sup>	1,76	135	8,35	1,75	0,7422
Cálcio na Raiz (g/Kg)	45	5,74 <sup>A</sup>	1,58	45	5,26 <sup>A</sup>	1,43	45	5,45 <sup>A</sup>	1,40	135	5,49	1,47	0,3145
Cálcio Total (g/Kg)	45	14,01 <sup>A</sup>	2,35	45	13,45 <sup>A</sup>	1,87	45	13,85 <sup>A</sup>	2,12	135	13,77	2,12	0,4381
Magnésio na Parte Aérea (g/Kg)	45	4,58 <sup>A</sup>	0,90	45	4,64 <sup>A</sup>	0,61	45	4,71 <sup>A</sup>	0,94	135	4,64	0,82	0,7744
Magnésio na Raiz (g/Kg)	45	9,68 <sup>A</sup>	2,20	45	10,02 <sup>A</sup>	2,11	45	9,61 <sup>A</sup>	2,11	135	9,78	2,13	0,6333
Magnésio Total (g/Kg)	45	14,26 <sup>A</sup>	2,19	45	14,66 <sup>A</sup>	2,19	45	14,32 <sup>A</sup>	2,14	135	14,42	2,16	0,6487
DARS <sup>1</sup>	45	2,594 <sup>A</sup>	24,87	45	2,201 <sup>A</sup>	19,47	45	1,858 <sup>A</sup>	16,96	135	22,32	20,91	0,2779

<sup>(\*)</sup> Teste (ANOVA) significativo ao nível de 5%; (1) a densidade de actinomicetos é expressa em UFC/g raiz = UFC x 10<sup>5</sup>. Então, tem-se (2,59 x 10<sup>5</sup>; 2,20 x 10<sup>5</sup> e 1,85 x 10<sup>5</sup>, respectivamente), para os valores médios da variável DARS na última linha da Tabela. Médias seguidas com letras iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si.

#### 4.2.2 Resultados da análise de variância

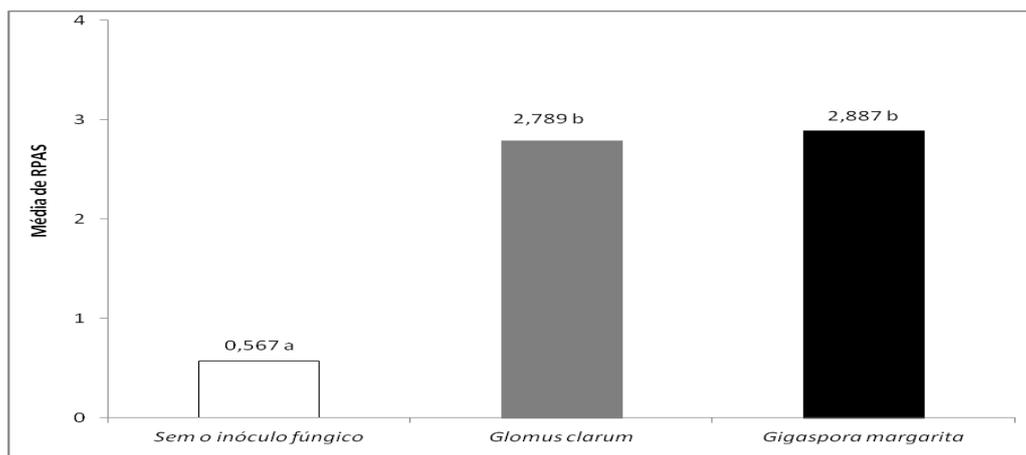
A apresentação dos resultados far-se-á por variável avaliada no experimento fatorial de acordo com resposta de interesse e as discussões acompanharão cada bloco de variáveis inter-relacionadas, como: variáveis de crescimento e desenvolvimento (BPAS, BRS, BPAS/BRS); variável de nodulação (BNS), variáveis de aspectos nutricionais (PPAS, PRAIZ, PTOTAL, KPAS, KRAIZ, KTOTAL, CaPAS, CaRAIZ, CaTOTAL, MgPAS, MgRAIZ, MgTOTAL) e densidade populacional de actinomicetos na rizosfera de soja (DARS).

##### 4.2.2.1. Variáveis de crescimento e desenvolvimento (BPAS, BRS, BPAS/BRS)

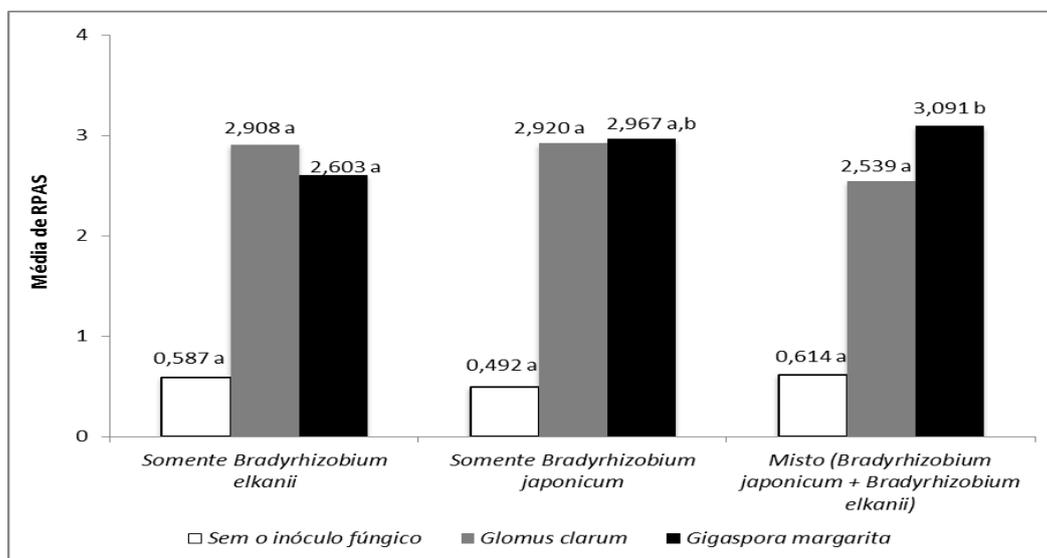
###### a) *Biomassa de Parte Aérea Seca (BPAS)*

O Apêndice A mostra que não existem diferenças significativas entre as médias da variável BPAS dos tratamentos que utilizaram o rizóbio (fator 2) e o modelo fatorial final para testar as diferenças de médias dessa variável manteve os fatores principais Fator1 e Fator2 e a sua interação. Com relação à interação, significa dizer que as médias de BPAS dos tratamentos que compõem o Fator1 (inóculo com FMA) são estatisticamente diferentes para, pelo menos, um tratamento que compõe o Fator2 (inóculo com rizóbio). As Figuras 2 e 3 apresentam justamente essa análise através do teste de comparações múltiplas de Tukey.

De acordo com a figura 2 a inoculação de FMA proporcionou um efeito significativo na BPAS de plantas de soja em relação à testemunha sem inóculo fúngico. Conforme a figura 3, quando a soja foi coinoculada com o FMA *Gigaspora margarita* e com a mistura de *B. elkanii* e *B. japonicum* (média = 3,091) constataram-se diferenças significativas entre as médias de BPAS em relação as plantas que foram coinoculadas com *Gigaspora margarita* e com a estirpe de *Bradyrhizobium elkanii* (média = 2,603). A figura 3 mostra exatamente a evolução das médias da variável BPAS para os tratamentos somente *B. elkanii*, somente *B. japonicum* e a mistura (*B. elkanii* e *B. japonicum*) dentro de cada um dos tratamentos realizados com Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA).



**Figura 2** - Comparações múltiplas das médias da variável BPAS para o fator 1 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de cores diferentes, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

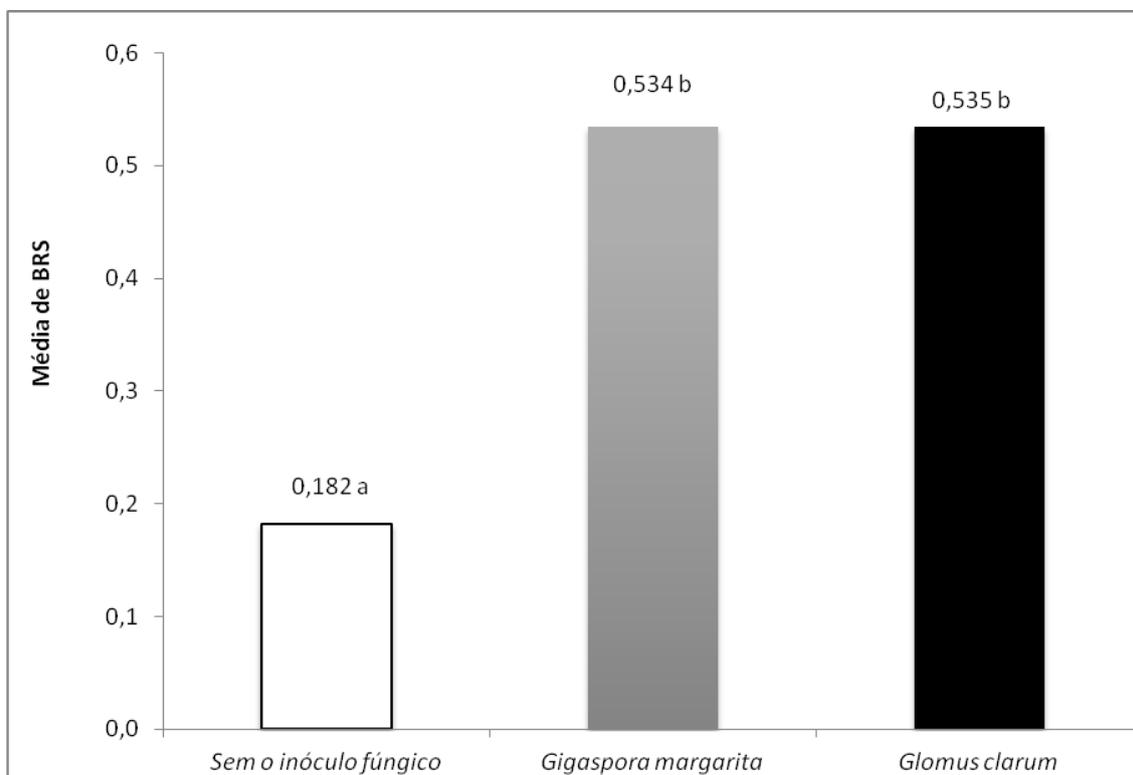


**Figura 3** - Comparações múltiplas das médias da variável BPAS para a interação entre os fatores 1 e 2 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de mesma cor, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

### b) **Biomassa de Raiz Seca (BRS)**

Semelhante ao que foi obtido para a variável BPAS, os resultados referentes à variável BRS mostram (Apêndice B) que somente o fator 1 foi significativo e importante para distinguir as médias dessa variável. Mais especificamente, os testes de comparações múltiplas (Figura 4) revelaram que a inoculação com *G. margarita* (média = 0,534) e *G. clarum* (média = 0,535)

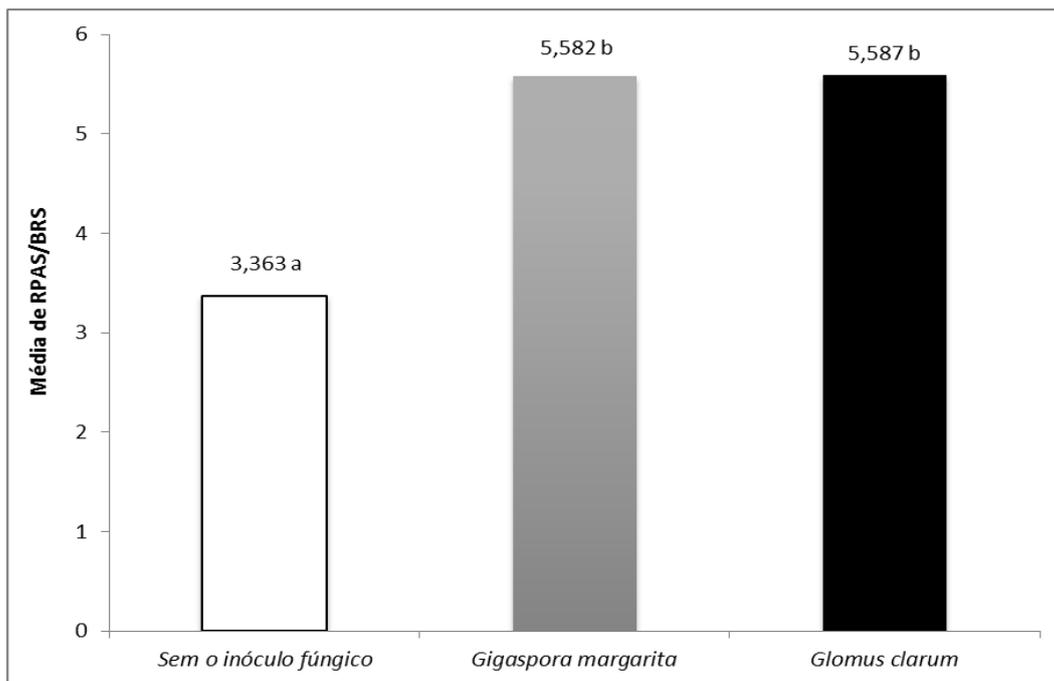
teve um efeito significativo na BRS de soja em relação as plantas que não receberam o inóculo fúngico (média = 0,182).



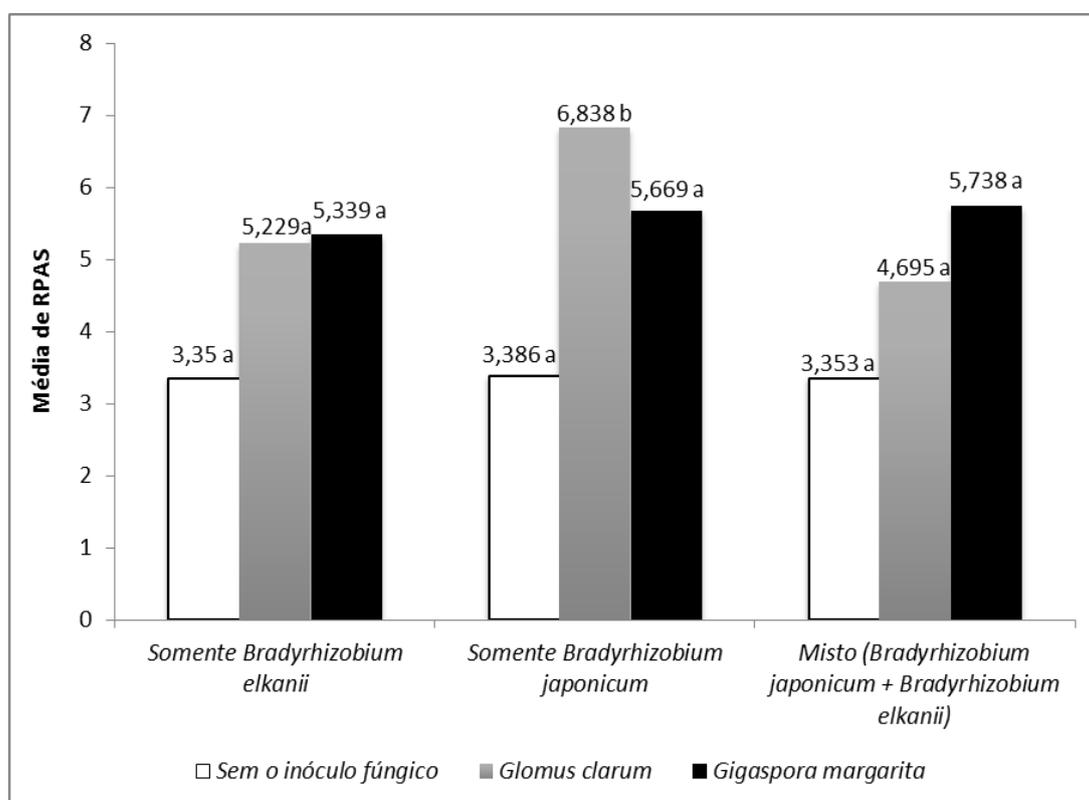
**Figura 4:** Comparações múltiplas das médias da variável BRS para o fator 1 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de cores diferentes, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

### c) **Relação BPAS/BRS**

A variável relação BPAS/BRS foi construída como sendo a razão entre as variáveis BPAS e BRS. Assim, os resultados foram muito semelhantes aos encontrados para a variável BPAS, isto é, um modelo final contendo a interação entre os fatores 1 e 2 (Apêndice C). De acordo com o teste de comparações múltiplas para o fator 1 (Figura 5), constatou-se um efeito significativo da inoculação com os dois morfotipos de FMA sobre a variável analisada em relação as plantas sem inóculo fúngico. E para a interação entre os fatores 1 e 2 (Figura 6), verificou-se que apenas as plantas coinoculadas com *B. japonicum* e com *Glomus clarum* (média = 6,838) apresentaram média significativamente diferente dos outros tratamentos. As Figuras 5 e 6 ilustram a evolução das médias da variável BPAS/BRS para o fator 1 e para a interação entre os fatores 1 e 2.



**Figura 5:** Comparações múltiplas das médias da variável relação BPAS/BRS para o fator 1 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de cores diferentes, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.



**Figura 6:** Comparações múltiplas das médias da variável relação BPAS/BRS para a interação entre os fatores 1 e 2 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de mesma cor, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

De acordo com os resultados apresentados acima, houve uma influência da inoculação dos isolados de FMA nas variáveis avaliadas de crescimento e desenvolvimento vegetal, ou seja, biomassa de parte aérea seca (BPAS) e biomassa de raiz seca (BRS) e a relação entre BPAS/BRS, pois as plantas inoculadas com FMA acumularam maior biomassa vegetal. Esta influência do fator 1 foi expressiva para a interação com as estirpes de *Bradyrhizobium* (fator 2) quando inoculados simultaneamente. Então, as plantas que foram coinoculadas com o FMA *G. margarita* mais o misto de *B. japonicum* + *B. elkanii*, cresceram mais e acumularam maior biomassa vegetal de parte aérea em relação à combinação *G. margarita* e *B. elkanii*. Já para a relação BPAS/BRS, as plantas que receberam o FMA *G. clarum* + estirpe BR 33 – *B. japonicum* tiveram uma relação maior entre biomassa de parte aérea e biomassa de raiz acumuladas, em relação à combinação *G. clarum* + misto de [*B. japonicum* + *B. elkanii*]. O que pode indicar uma interação sinérgica entre os componentes do sistema simbiótico tripartite, soja – FMA – *Bradyrhizobium* spp.

É notória na literatura a influência que os fungos micorrízicos exercem sobre efeitos não nutricionais (SIQUEIRA et al., 2007; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). De acordo com estes autores, esses efeitos adicionais à melhoria nutricional estão relacionados com a ação biorreguladora da simbiose micorrízica através da produção de estimulantes de crescimento, melhoria na relação água-planta e alterações bioquímicas e fisiológicas. Uma diversidade de compostos e moléculas, como auxinas, citocininas, giberelinas, vitaminas e compostos orgânicos bioativos acumulam-se em maior quantidade em plantas micorrizadas.

Alguns resultados de pesquisas evidenciaram o efeito benéfico de FMA sobre o crescimento e maior acúmulo de biomassa na parte aérea seca e raiz seca de soja (PAULA; SIQUEIRA; HOSHIKA, 1990; PAULA; SIQUEIRA, 1987; SIQUEIRA; PAULA, 1986; VEJSADOVA et al., 1993), o que confirma os nossos resultados. Vejsadova et al. (1993), investigando a influência da inoculação simultânea de *B. japonicum* e *Glomus claroideum* em soja, constataram que a biomassa de raízes foi significativamente maior com a coinoculação citada somente em 4 semanas depois de plantadas e a biomassa

de parte aérea seca foi significativamente maior (+ 20%) em plantas micorrizadas em relação as não micorrizadas.

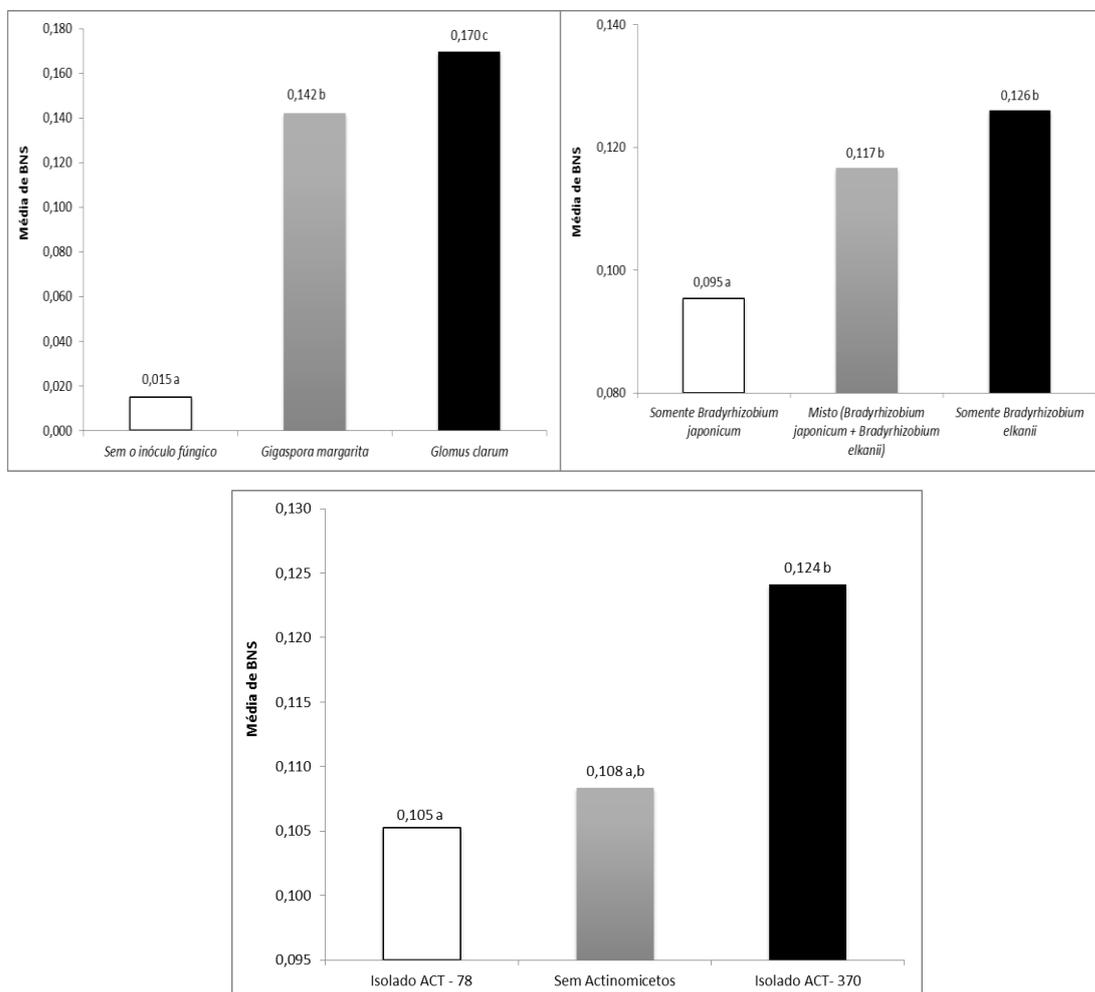
#### **4.2.2.2. Variável de nodulação (BNS)**

##### **a) Biomassa de Nódulo Seco (BNS)**

O modelo fatorial final para a variável BNS contemplou todos os fatores individuais, bem como a interação entre os fatores 1 e 3 (Apêndice D). De acordo com os testes de comparações múltiplas para os fatores individuais (Figura 7), constatou-se que as médias de BNS para os tratamentos envolvendo o fator1(FMA) são todas diferentes. Portanto, fica evidenciado o efeito significativo da inoculação dos FMA (*G. margarita* e *G. clarum*) sobre a biomassa de nódulos secos em plantas de soja cv. Seridó, sugerindo um efeito sinérgico dos FMA sobre as estirpes de *Bradyrhizobium sp.* (BR 33 e BR 29). Para o fator 2 (Rizóbios), nota-se que a média das plantas que receberam somente a estirpe de *B. japonicum* (BR 33) foi de (0,095) diferindo, estatisticamente das médias dos outros tratamentos desse fator, que foram maiores para BNS, influenciando mais essa variável os tratamentos que receberam a coinoculação de uma mistura de *B. japonicum* (BR 33) + *B. elkanii* (BR 29) com média igual a (0,117) e somente *B. elkanii* (BR 29) com média igual a (0,126). Para o fator 3 (actinomicetos), observou-se que a média do isolado ACT - 78 (0,105) difere da média do grupo isolado ACT- 370 (0,124), mas ambas não diferem do grupo sem actinomicetos. O que denota uma tendência de influência positiva do isolado ACT-370 sobre a variável BNS e um efeito negativo do isolado ACT-78 sobre a BNS.

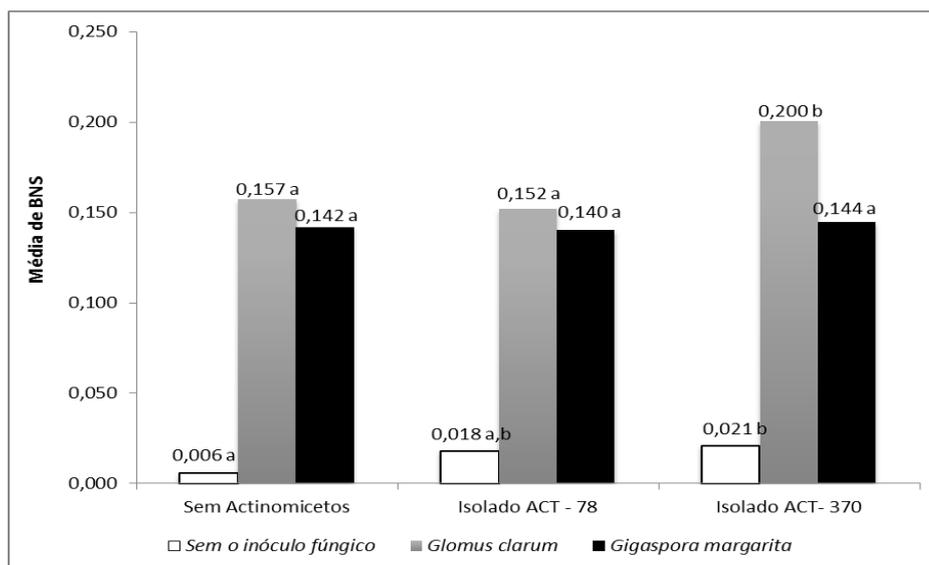
Já as comparações múltiplas do fator 1 avaliadas dentro de cada nível do fator 3 são mostradas na Figura 8. A análise é semelhante ao que foi apresentado no parágrafo anterior, sendo que ela deve ser avaliada dentro de cada tratamento do fator 1. De um modo geral, nota-se que as médias dos grupos sem actinomicetos (0,006) e isolado ACT- 370 (0,021) diferem estatisticamente para as plantas sem inoculação fúngica, enquanto que para as plantas inoculadas simultaneamente com *Glomus clarum* e ACT - 370, as diferenças significativas foram encontradas com média igual a (0,200) em relação a outros tratamentos. Então, parece haver uma interação de

cooperação ou sinergismo entre *G. clarum* e o isolado ACT-370, pois quando presentes de modo simultâneo influenciaram significativamente a biomassa de nódulos secos.



**Figura 7:** Comparações múltiplas das médias da variável BNS os fatores 1, 2 e 3 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de cores diferentes, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

A presença ampla dos fungos micorrízicos arbusculares em simbiose com as leguminosas que se associam com o rizóbio para a fixação biológica do nitrogênio, caracterizando um sistema simbiótico tripartite envolvendo planta-FMA-rizóbio, tem influenciado a nodulação em número de nódulos e em biomassa de nódulos secos, conforme constatado em nossos resultados descritos acima. Outra influência é sobre a atividade do rizóbio dentro dos nódulos (BAREA et al., 2005). Estes processos já são reconhecidos universalmente e nos últimos 50 anos muitos trabalhos de pesquisa tem sido realizados para estudá-los.



**Figura 8:** Comparações múltiplas das médias da variável BNS para a interação entre os fatores 1 e 3 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de mesma cor, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

Neste sentido, alguns autores têm demonstrado a influência da micorrização na biomassa de nódulos secos, tanto na soja como em outras plantas de interesses agrosilvipastoris (AMES; BETLHENFALVAY, 1987ab; DANIELS-HYLTON; AHMAD, 1994). Estes autores observaram que a inoculação conjunta de FMA e estirpes de rizóbio influenciam no crescimento vegetal, no número de nódulos, peso de nódulos secos, colonização micorrízica e teores de N e P no fitossimbionte.

A interação entre fungos micorrízicos arbusculares e as estirpes de rizóbio é um típico exemplo de sinergismo entre micro-organismos rizosféricos (THIAGARAJAN; AHMAD, 1993). Em um estudo, Nambiar e Anjiah (1989), observaram em plantas de amendoim que a presença de FMA (*Acaulospora laevis* ou *Glomus fasciculatus*) altera a taxa de nódulos formados por estirpes inoculadas em mistura e que o sinergismo é diferenciado para cada uma das estirpes estudadas.

Por outro lado, em estudo envolvendo a interação de FMA, rizóbio, actinomicetos e soja, em casa de vegetação, Pereira et al. (1991), trabalhando com inóculos de ACT-78 (antagônico a estirpe BR-33 – *B. japonicum*), *Glomus etunicatum*, e estirpe BR-33, observaram que a inoculação de actinomicetos reduziu a do rizóbio e aumentou o rendimento de matéria seca da parte aérea.

A colonização micorrízica foi reduzida na presença do rizóbio e completamente inibida com a inoculação do actinomiceto. Este resultado leva a suspeição de que o isolado de actinomiceto ACT-78 desenvolva antibiose para FMA do gênero *Glomus* spp., haja vista que coincidentemente sua interação com o FMA *Glomus clarum* neste trabalho, tem uma tendência ao antagonismo. Isto precisa ser melhor investigado.

#### **4.2.2.3. Variáveis de aspectos nutricionais (PPAS, PRAIZ, PTOTAL, KPAS, KRAIZ, KTOTAL, CaPAS, CaRAIZ, CaTOTAL, MgPAS, MgRAIZ, MgTOTAL)**

##### **a) Teores de Fósforo: teor de fósforo na parte aérea (PPAS), teor de fósforo na raiz (PRAIZ) e o teor total de fósforo na planta (PTOTAL)**

Para a variável PPAS manteve-se no modelo final a interação entre os fatores 2 (rizóbio) e 3 (actinomicetos) que foi significativa a 5% de probabilidade (Apêndice E). As variáveis envolvendo os teores de Fósforo na raiz (PRAIZ) e os teores total na planta (PTOTAL) estão intimamente relacionados (Apêndice F).

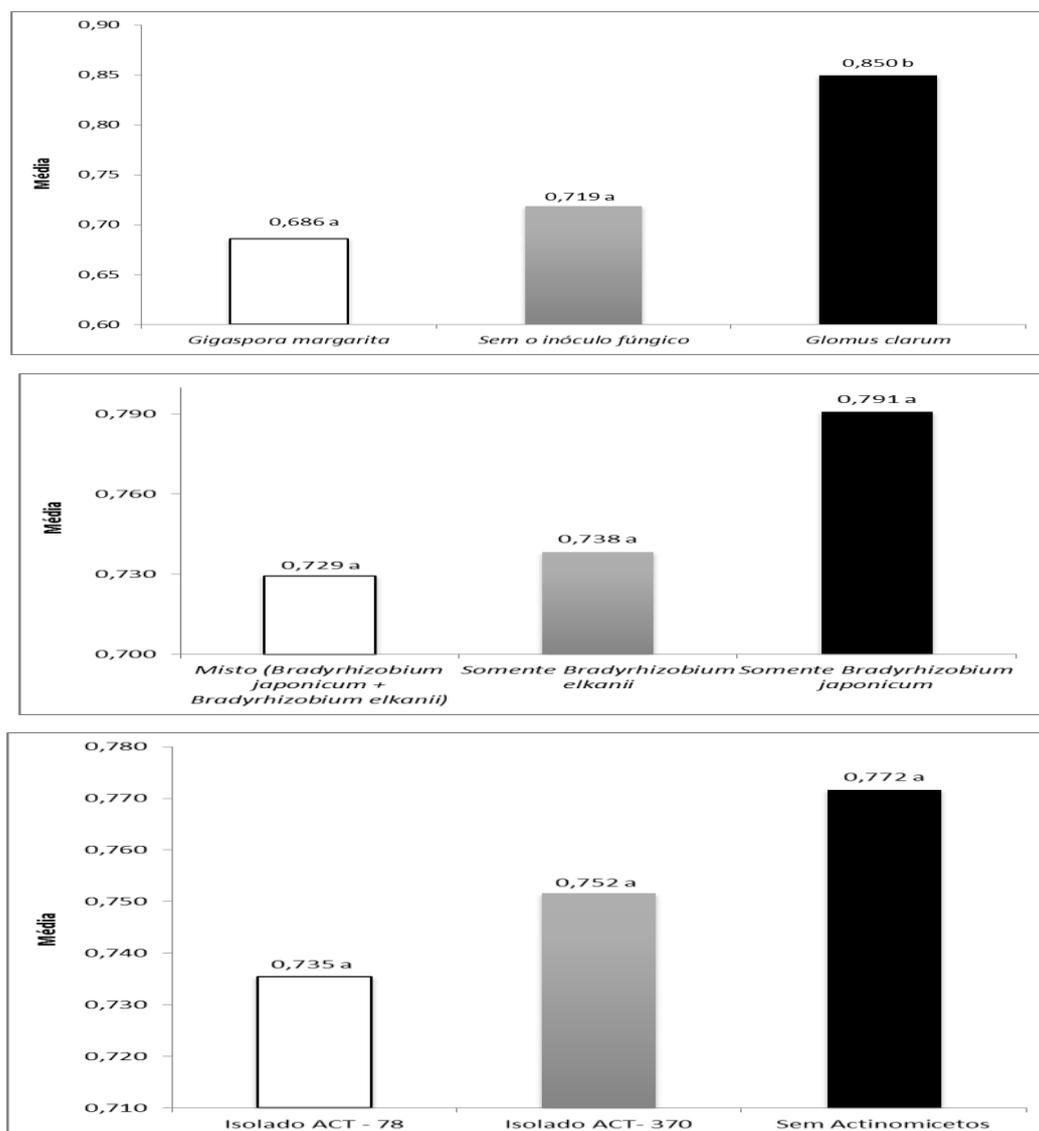
A Figura 9 ilustra a evolução das médias da variável PPAS para os fatores 1, 2 e 3; a figura 10 ilustra a evolução das médias da variável PPAS para a interação entre os fatores 2 e 3 e as figuras 11(a) e 11(b) ilustram a evolução das médias das variáveis PRAIZ e PTOTAL para o fator 1 (FMA), respectivamente.

De acordo com a figura 9, podemos destacar a influência que o fator FMA – *Glomus clarum* teve no acúmulo de fósforo na parte aérea da planta em relação aos outros tratamentos para este fator. Já para as variáveis PRAIZ e PTOTAL permaneceu no modelo fatorial final apenas o fator 1, cujas médias dos três tratamentos (“Sem inóculo fúngico”, “com inoculação de *Gigaspora Margarita*” e “com inoculação de *Glomus Clarum*”) foram todas distintas entre si (Figura 11).

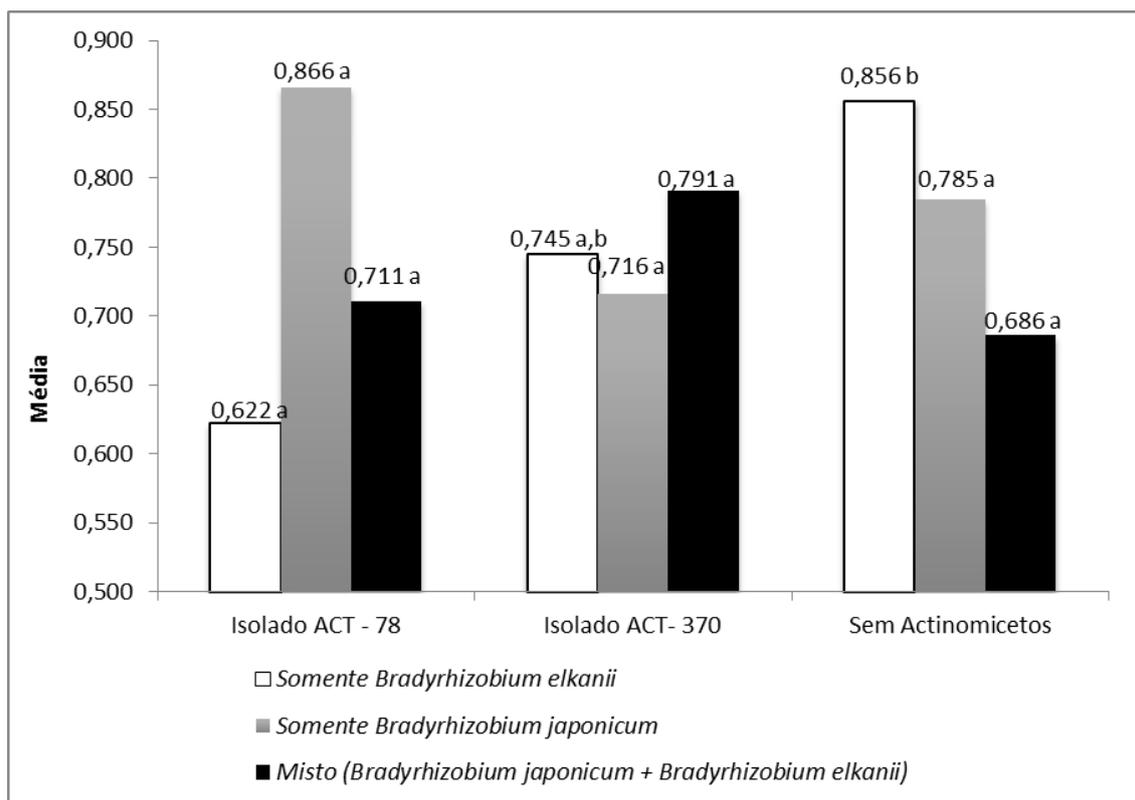
Conforme a figura 10 constatou-se que o tratamento em que as plantas foram inoculadas com [*Bradyrhizobium elkanii* (BR 29) sem actinomicetos], apresentaram maiores teores de fósforo na parte aérea seca (0.856) em relação às plantas que foram coinoculadas com [*Bradyrhizobium elkanii* (BR

29) + acinomiceto – ACT 78] com teor médio igual a (0,622) e em relação às plantas que receberam simultaneamente [*Bradyrhizobium elkanii* (BR 29) + acinomiceto – ACT 370] com teor médio igual a (0,745). Estes resultados sugerem um efeito antagônico do ACT-78 sobre a estirpe BR 29 de *Bradyrhizobium elkanii* para a variável PPAS.

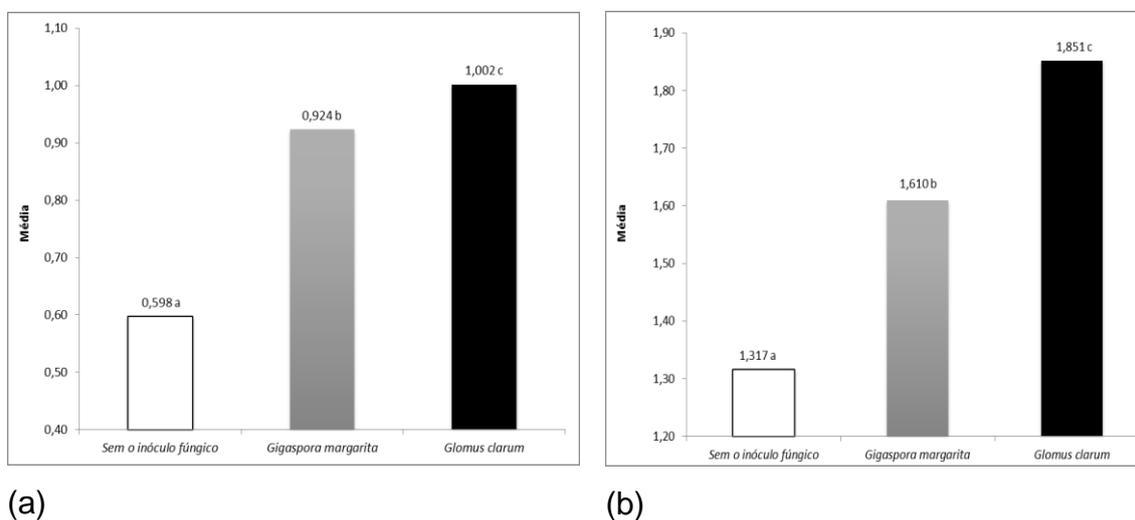
Analisando os resultados para as variáveis PPRAIZ e PTOTAL, de um modo geral, o fator 1 (FMA), como já era o esperado, foi o que mais influenciou as médias de teores de fósforo nas plantas de soja, respectivamente (figura 11).



**Figura 9:** Comparações múltiplas das médias da variável PPAS para os fatores 1, 2 e 3 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de cores diferentes, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.



**Figura 10:** Comparações múltiplas das médias da variável PPAS para a interação entre os fatores 2 e 3 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de mesma cor, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.



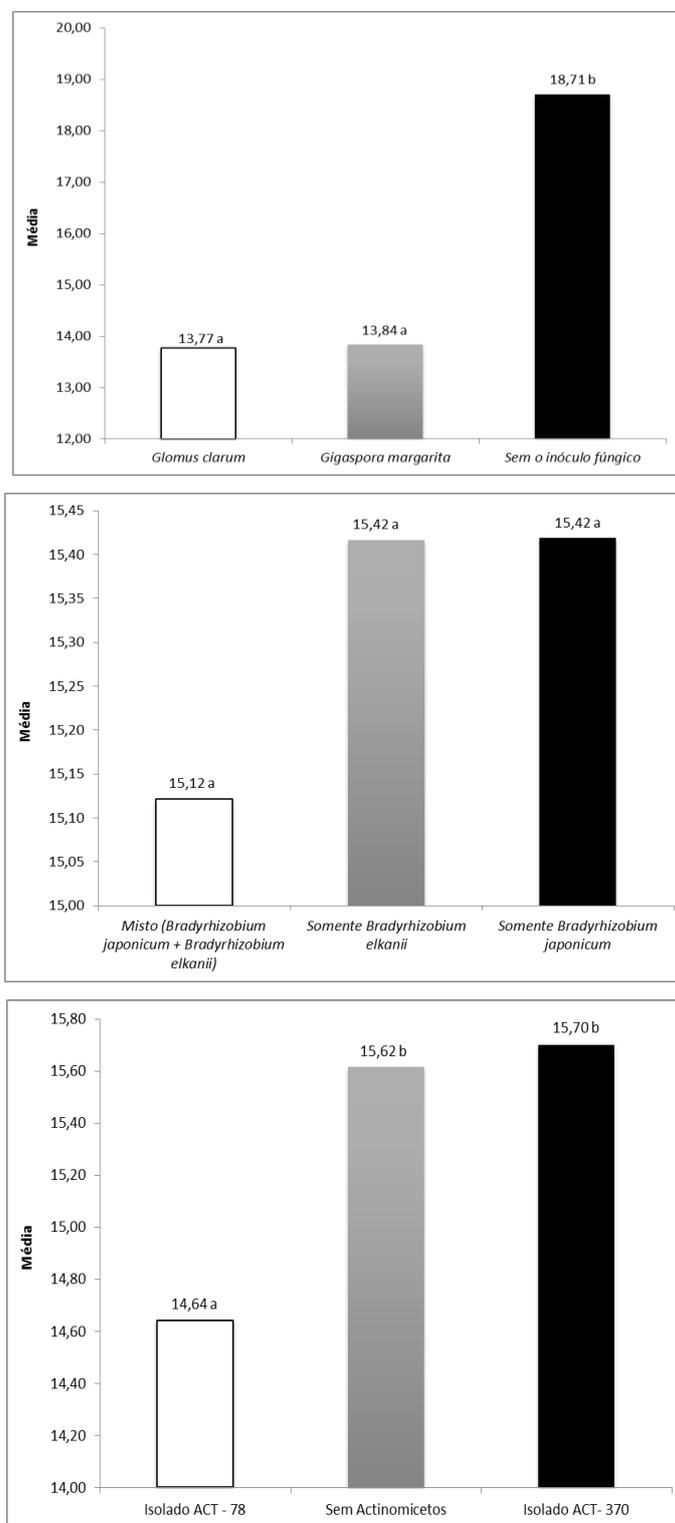
**Figura 11:** Comparações múltiplas das médias das variáveis PRAIZ (a) e PTOTAL (b) para o fator 1 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de cores diferentes, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

**b) Teores de Potássio – teor de potássio na parte aérea (KPAS), teor de potássio na raiz (KRS) e teor total de potássio na planta (KTOTAL)**

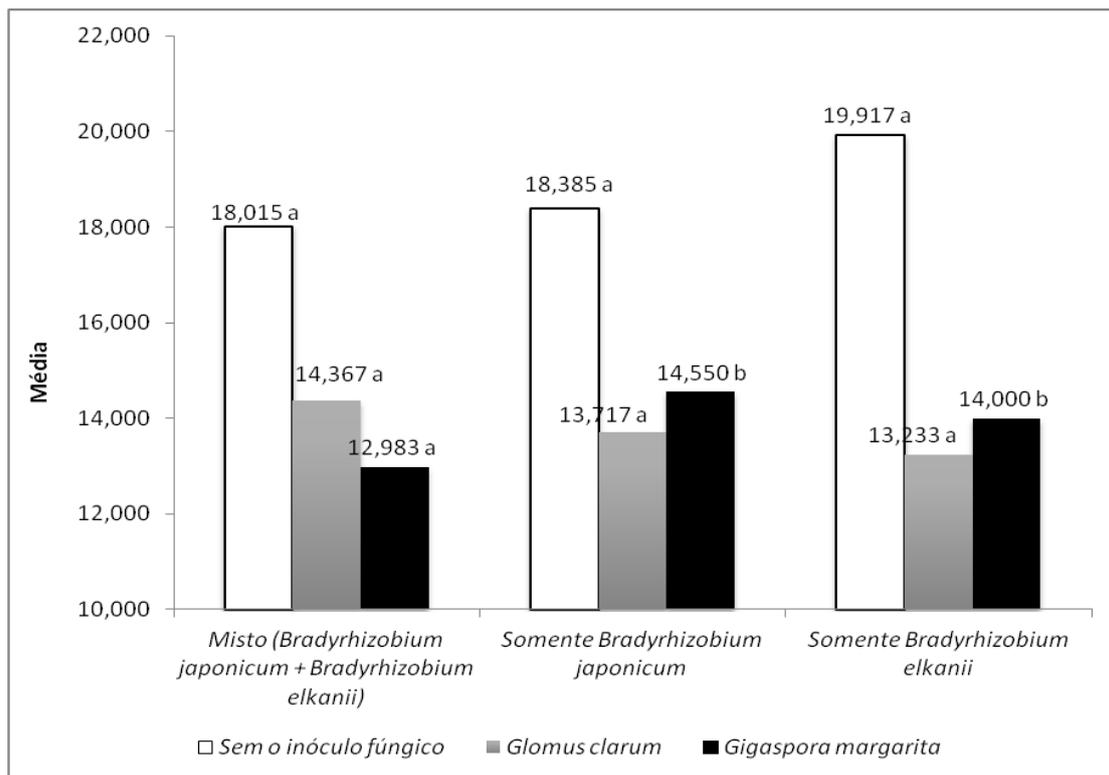
Para o teor de Potássio na parte aérea da planta (KPAS) (figuras 12, 13, 14 e 15), o modelo final foi completo, contemplando todos os fatores simples e todas as interações duas-a-duas (Apêndice G). Sendo assim, conforme mostram os resultados da Figura 12, o valor médio do teor de K na parte aérea das plantas que não foram inoculadas com o FMA (18,71) foi maior em relação as plantas que receberam o inóculo fúngico (13,77 – *G. clarum* e 13,84 – *G. margarita*) e o valor médio do teor de K na parte aérea das plantas que receberam o isolado ACT-370 (15,70) foi mais significativo do que o teor de K das plantas que foram inoculadas com ACT-78 (14,64). Já para a análise das diferenças das médias para a interação entre os fatores 1 (FMA) e 2 (rizóbio) (Figura 13), houve diferença significativa entre as médias das plantas que foram coinoculadas com *B. japonicum* e *G. margarita* com média igual a (14,550) em relação as plantas que foram coinoculadas com um misto (*B. japonicum* + *B. elkanii*) e *Gigaspora margarita* com média igual a (12,983). Percebe-se ainda que para esta variável não houve diferença significativa entre os valores médios das plantas que foram coinoculadas com *G. margarita* e a estirpe BR 33 de *Bradyrhizobium japonicum* (14,550) e com *G. margarita* e a estirpe BR 29 de *Bradyrhizobium elkanii* (14,00). Estes resultados indicam um teor maior de potássio acumulado na parte aérea da planta de soja cv. Seridó quando foram coinoculadas com as estirpes de *Bradyrhizobium spp.* e o FMA *G. margarita*.

Além disso, de acordo com a figura 14, quando se investiga as diferenças dos tratamentos do fator 3 (actinomicetos) dentro dos níveis do fator 1 (FMA), para a variável KPAS, observa-se que as plantas que não receberam nem o inóculo de FMA e nem o inóculo de actinomicetos apresentaram um valor médio maior (20,368) em relação as plantas que não receberam o inóculo de FMA mas que foram inoculadas somente com ACT-78 (17,191). Constatou-se também que as plantas que foram coinoculadas com (*Gigaspora margarita* + isolado ACT-370) apresentaram valor médio maior (14,900) diferente significativamente em relação às plantas que foram coinoculadas com

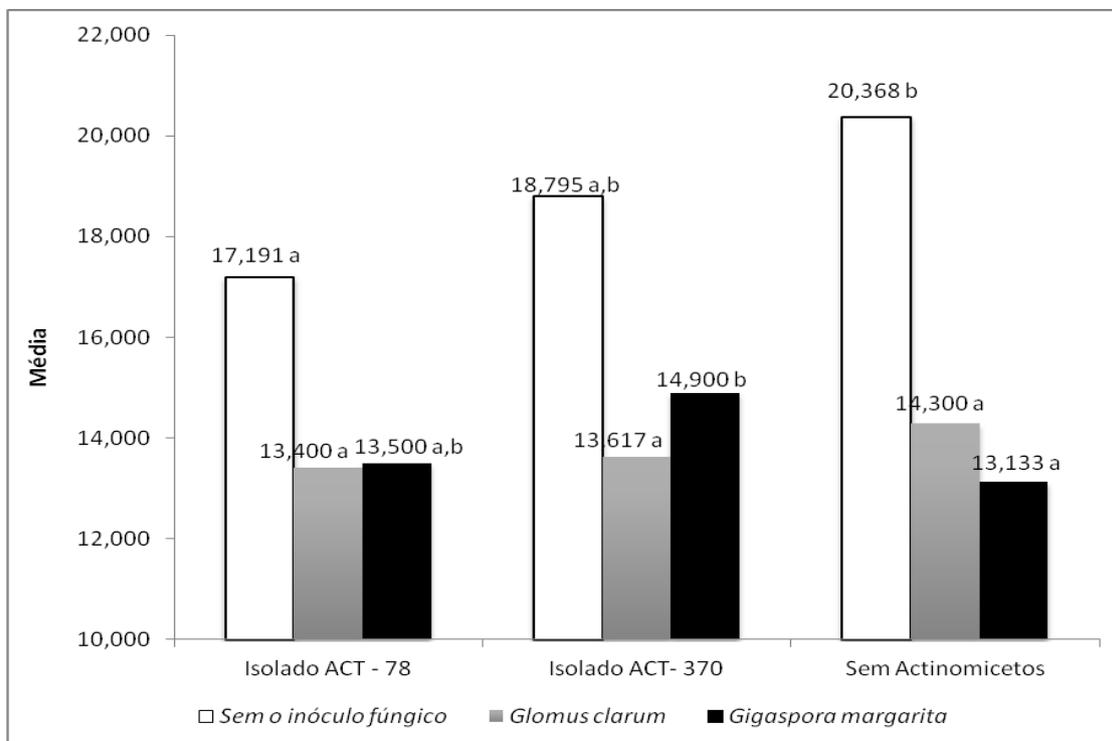
(*Gigaspora margarita* + isolado ACT-78), com valor médio igual a (13,500) ou que foram inoculadas somente com *G. margarita*, com valor médio igual a (13,133).



**Figura 12:** Comparações múltiplas das médias da variável KPAS para os fatores 1, 2 e 3 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra minúscula entre colunas de cores diferentes, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

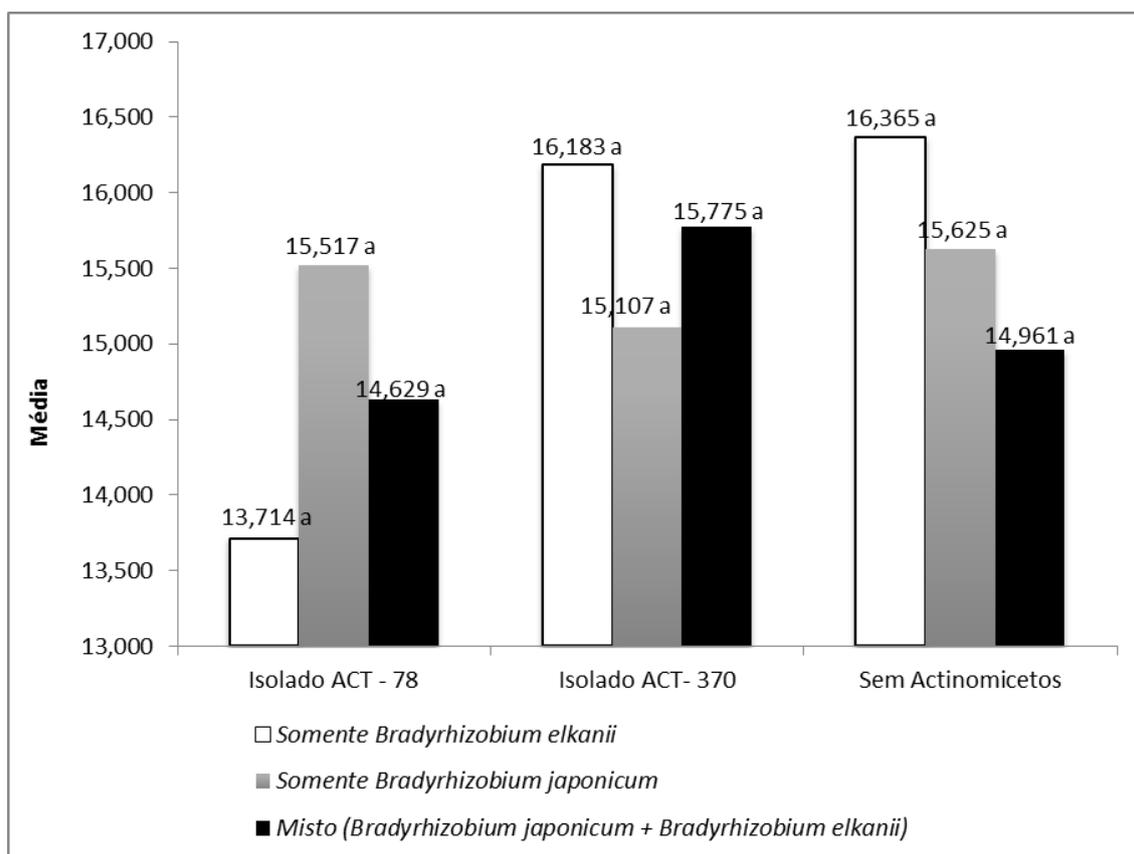


**Figura 13:** Comparações múltiplas das médias da variável KPAS para a interação entre os fatores 1 e 2 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de mesma cor, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.



**Figura 14:** Comparações múltiplas das médias da variável KPAS para a interação entre os fatores 1 e 3 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de mesma cor, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

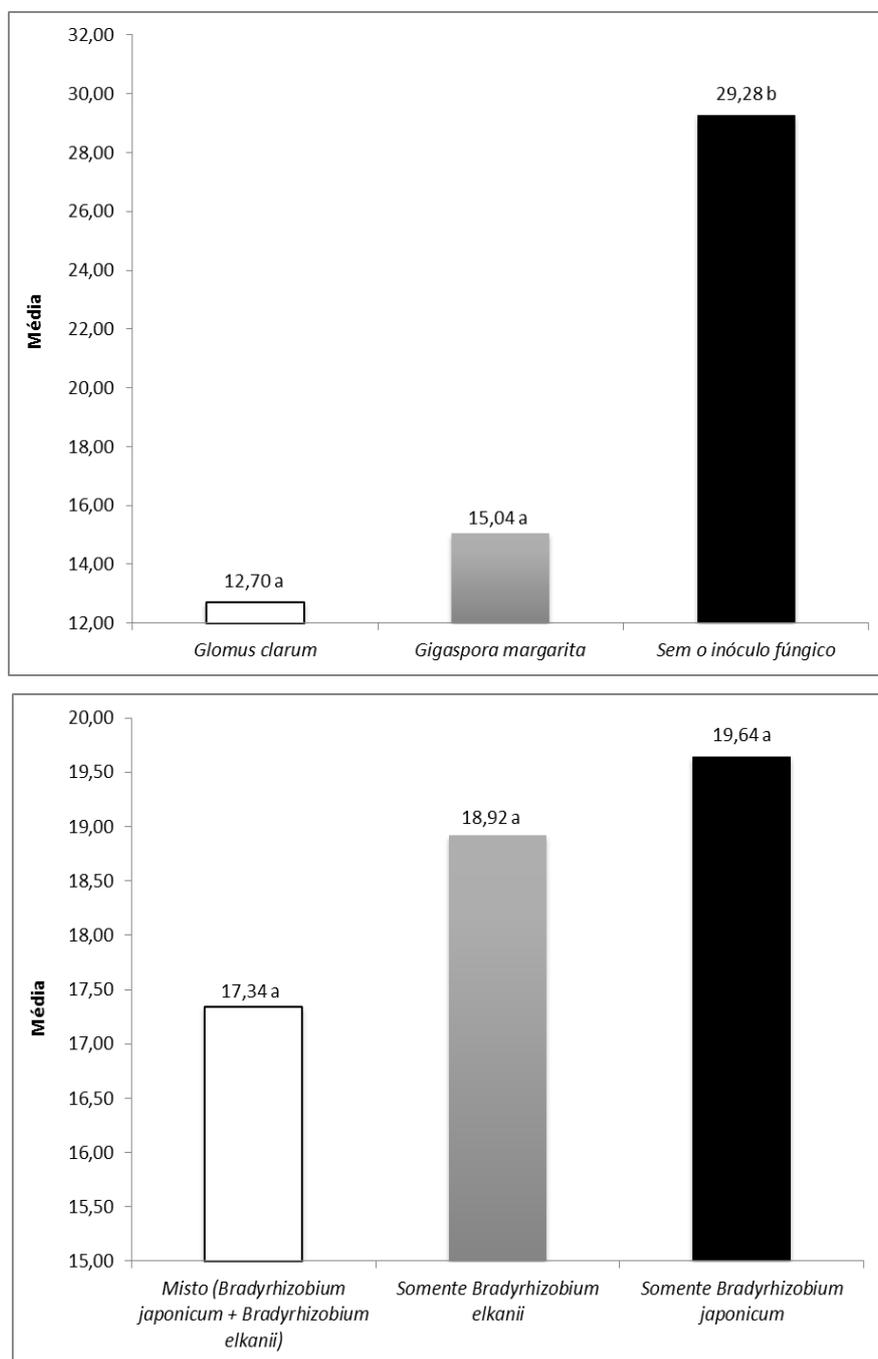
Estes resultados sugerem um efeito depressivo do ACT-78 e uma ação de sinergismo entre o FMA *G. margarita* e o ACT-370 sobre o acúmulo de K na parte aérea seca de soja, respectivamente. Já para a interação entre os fatores 2 e 3 (figura 15), não foi constatado nenhum efeito significativo para a variável KPAS entre os tratamentos.



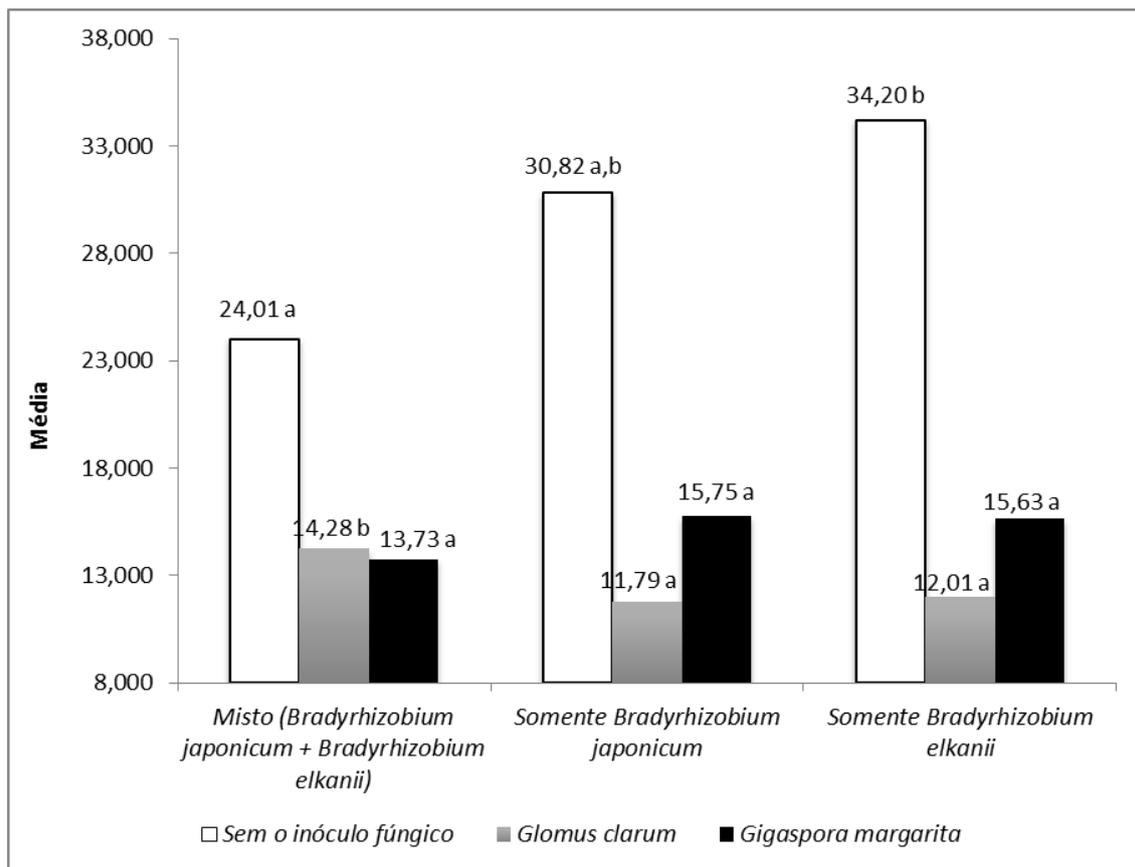
**Figura 15:** Comparações múltiplas das médias da variável KPAS para a interação entre os fatores 2 e 3 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de mesma cor, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

Já para os teores de potássio nas raízes da soja (KRAIZ) (figuras 16 e 17), a interação entre os fatores 1 e 2 foi importante para a avaliação do desempenho médio dessa variável (Apêndice H). De acordo com a figura 17, em especial, nota-se que os tratamentos que compõem o fator 2 (rizóbio) produziram concentrações médias distintas, principalmente para àquelas plantas que foram inoculadas somente com a [estirpe BR 29 de *B. elkanii* sem o inóculo fúngico] com valor médio de (34,20) em relação as plantas que

receberam um [inóculo misto contendo as duas estirpes de *Bradyrhizobium* spp e sem inóculo fúngico] e que atingiram um valor médio igual a (24,01).

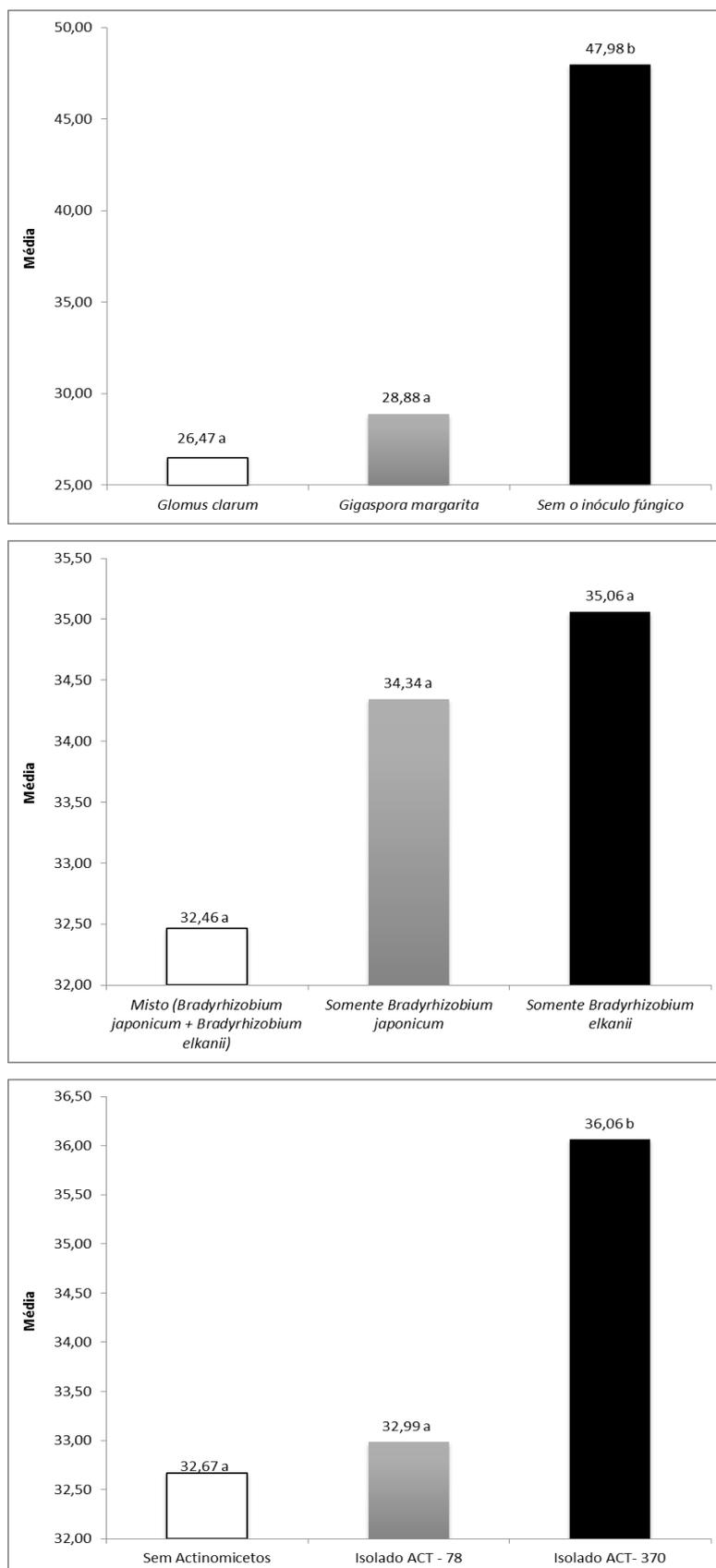


**Figura 16:** Comparações múltiplas das médias da variável KRAIZ para os fatores 1 e 2 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de cores diferentes, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

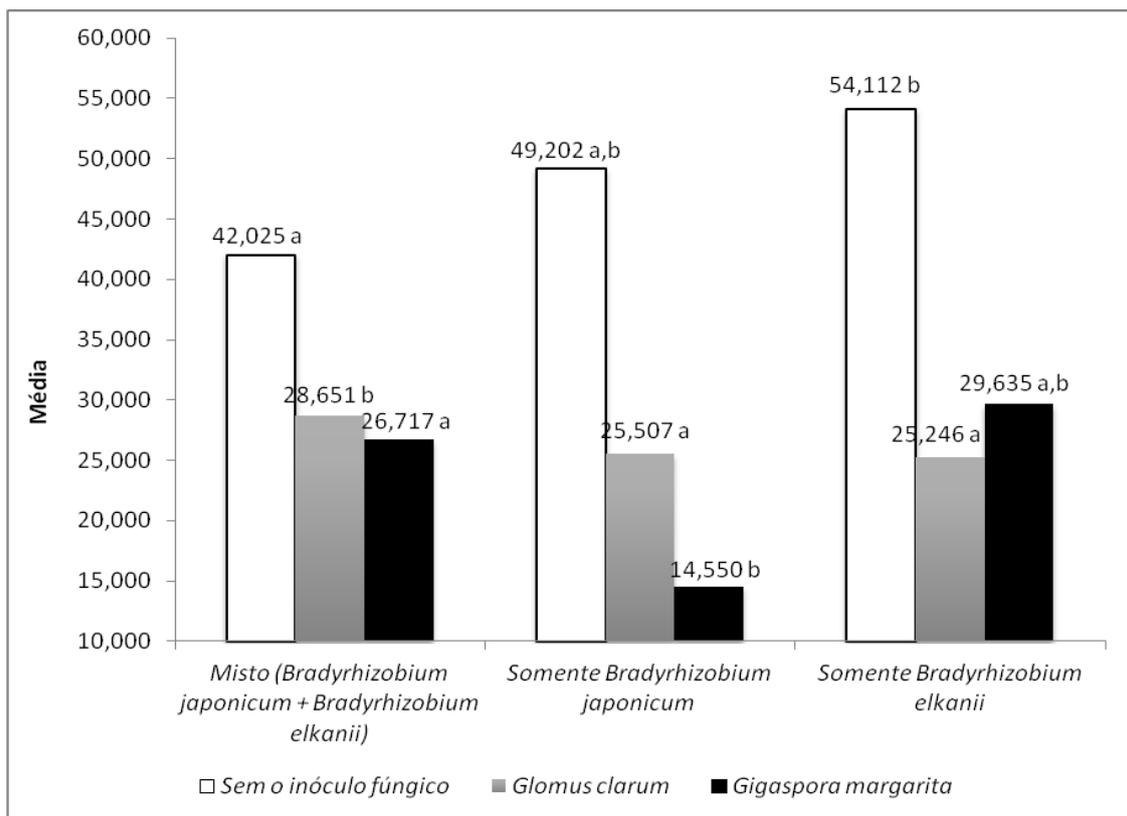


**Figura 17:** Comparações múltiplas das médias da variável KRAIZ para a interação entre os fatores 1 e 2 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de mesma cor, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

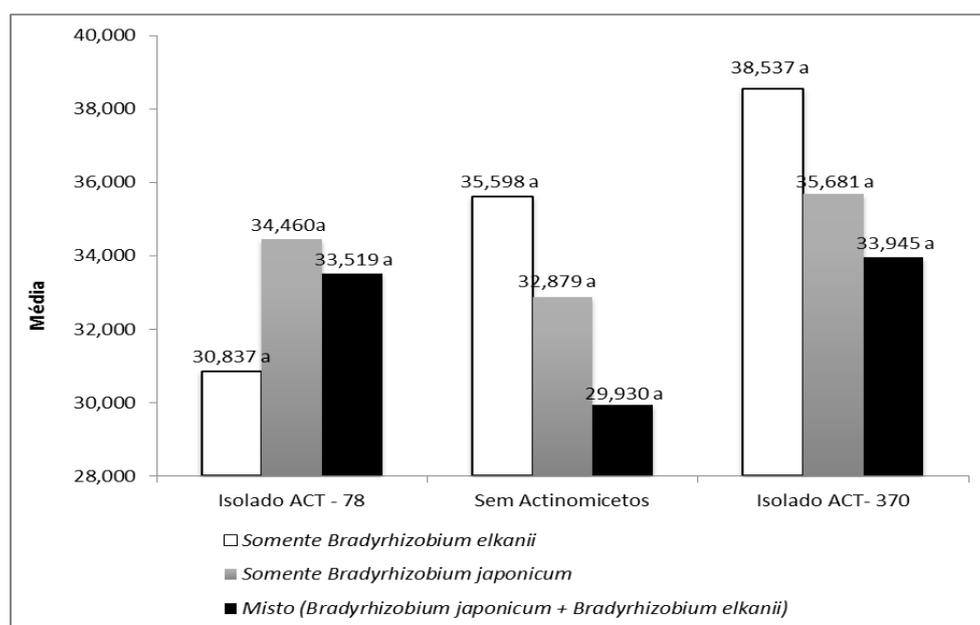
Por fim, para os teores totais de potássio (KTOTAL - figuras 18 – 20), o modelo final (Apêndice I) só não contemplou a interação entre os fatores 1 (FMA) e 3 (actinomicetos), se parecendo muito com a estrutura do modelo proposto para a variável KPAS. A diferença estatística está basicamente nos resultados encontrados para as interações entre os fatores 1 (FMA) e 2 (rizóbio) e 2 (rizóbio) e 3 (actinomicetos). Para a interação entre os fatores 1 e 2, observou-se que todos os níveis do fator 1 forneceram diferenças estatísticas nos teores médios para, pelo menos, 2 tratamentos do fator 2 (Figura 19), enquanto que a interação entre os fatores 2 e 3 não apresentou quaisquer diferenças significativas (Figura 20).



**Figura 18:** Comparações múltiplas das médias da variável KTOTAL para os fatores 1, 2 e 3 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de cores diferentes, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.



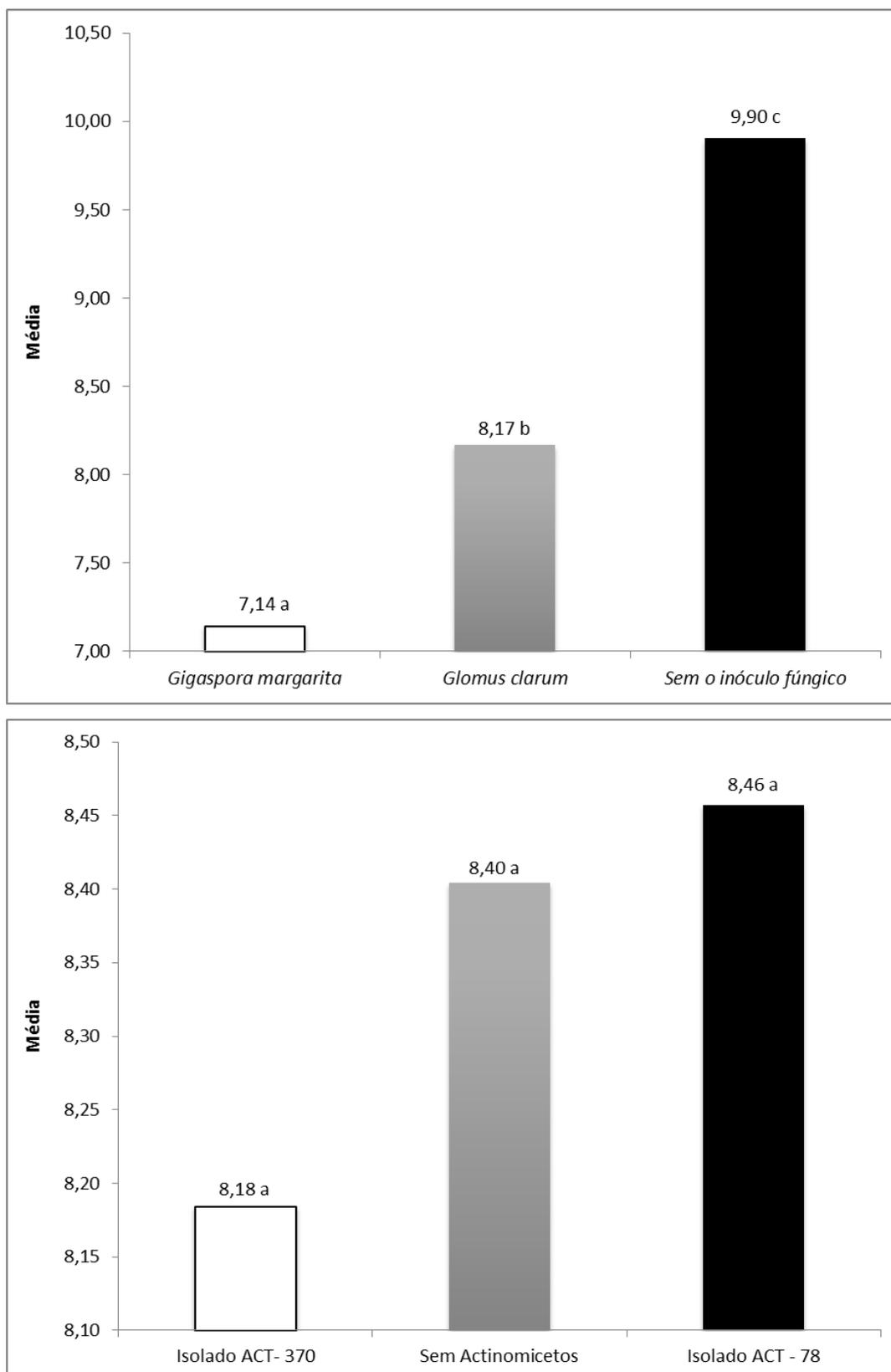
**Figura 19:** Comparações múltiplas das médias da variável KTOTAL para a interação entre os fatores 1 e 2 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de mesma cor, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.



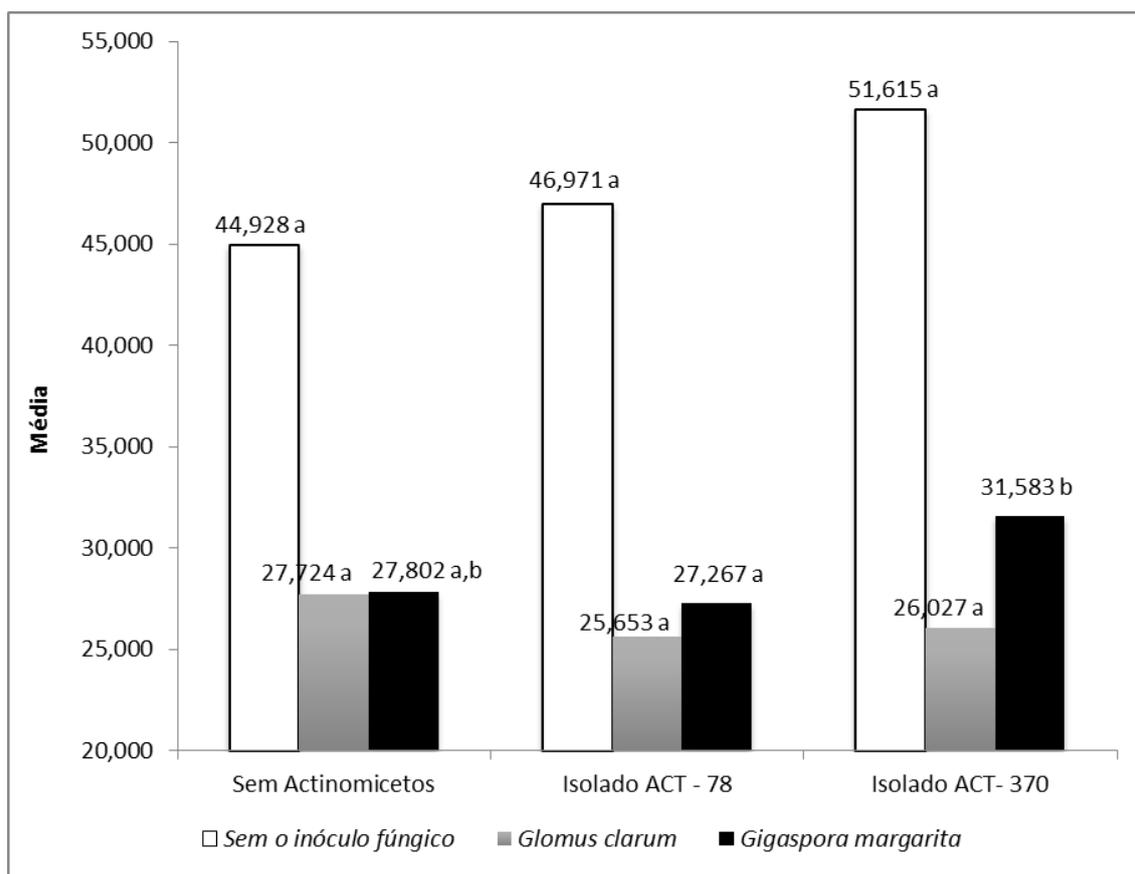
**Figura 20:** Comparações múltiplas das médias da variável KTOTAL para a interação entre os fatores 2 e 3 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de mesma cor, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

**c) Teores de Cálcio – teor de cálcio na parte aérea (CaPAS), teor de cálcio na raiz (CaRAIZ) e teor total de cálcio na planta (CaTOTAL)**

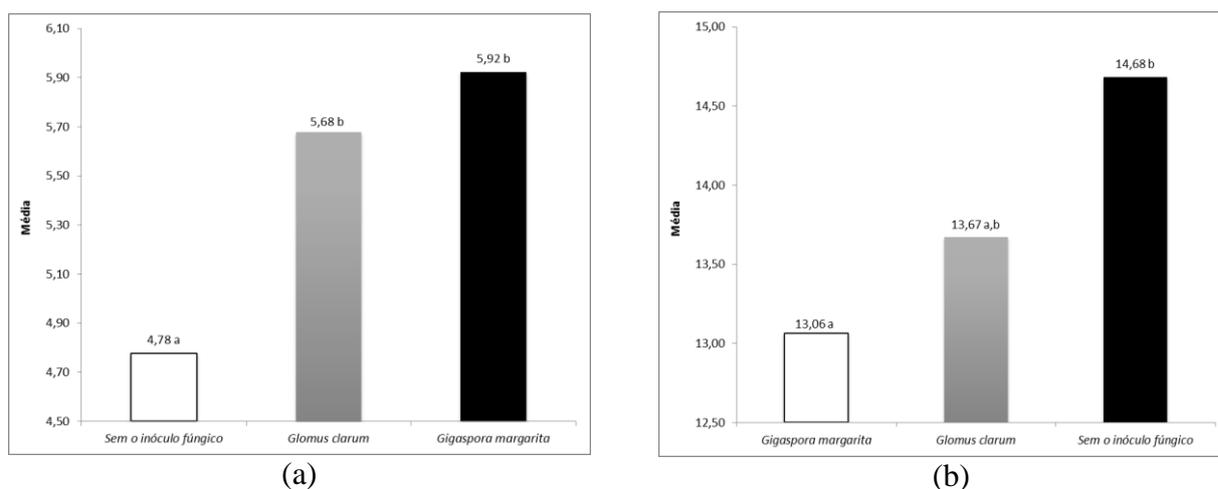
Os resultados para os teores de Cálcio na planta, ou seja, teor na parte aérea (CaPAS), teor na raiz (CaRAIZ) e teor total (CaTOTAL) tiveram o seguinte comportamento: nos modelos finais produzidos para a variável (CaPAS) estão contemplados os fatores 1 e 3 (Apêndice J) ou apenas o fator 1 para as variáveis (CaRAIZ) e (CaTOTAL) (Apêndice K). Então, quando o fator 1 é analisado (Figura 21), verifica-se que as plantas que receberam inóculo de FMA, *G. margarita* e *G. clarum*, apresentaram valores médios diferentes estatisticamente entre si, de teores de Ca na parte aérea em relação as plantas que não receberam nenhum tipo de FMA, que inclusive tiveram um valor médio maior (9,904). Quando a interação entre os fatores 1 e 3 é analisada (Figura 22), percebe-se que nas plantas de soja que receberam coinoculação do FMA *Gigaspora margarita* e actinomiceto - ACT-370, o teor de Ca na parte aérea foi diferente para mais (média = 31,583) em relação ao teor das plantas coinoculadas com esse FMA e ACT-78, que tiveram um valor médio de teor de Ca menor (= 27,267). Essa relação pode indicar de modo indireto a ocorrência de uma interação sinérgica entre *G. margarita* e ACT-370 e uma interação antagônica entre ACT-78 e *G. margarita*, para essa variável. Então é evidente em especial a ação do fungo *Gigaspora margarita* que provoca diferenças significativas entre os tratamentos do fator 3 (Figura 22). Para a variável CaRAIZ (Figura 23) percebe-se que as plantas inoculadas tanto com *G. margarita* quanto com *G. clarum* apresentaram teores médios mais elevados do que aquelas que não receberam esse tipo de inóculo, enquanto para a variável CaTOTAL (Figura 23), embora as plantas que receberam tanto o inóculo de *G. clarum* quanto de *G. margarita*, não tenham apresentado valores diferentes estatisticamente entre si, aquelas que receberam *G. margarita* tiveram teores de CaTOTAL diferentes para menos (média = 13,063) das plantas que não foram inoculadas com nenhum FMA (com valor médio = 14,681).



**Figura 21:** Comparações múltiplas das médias da variável CaPAS para os fatores 1 e 3 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de cores diferentes, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.



**Figura 22.** Comparações múltiplas das médias da variável CaPAS para a interação entre os fatores 1 e 3 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de mesma cor, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

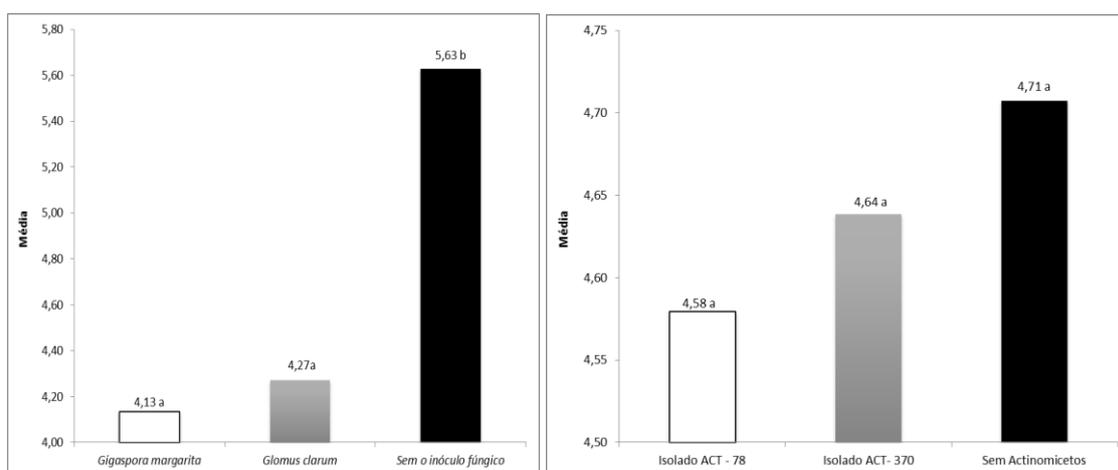


**Figura 23.** Comparações múltiplas das médias das variáveis CaRAIZ (a) e CaTOTAL (b) para o fator 1 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de cores diferentes, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

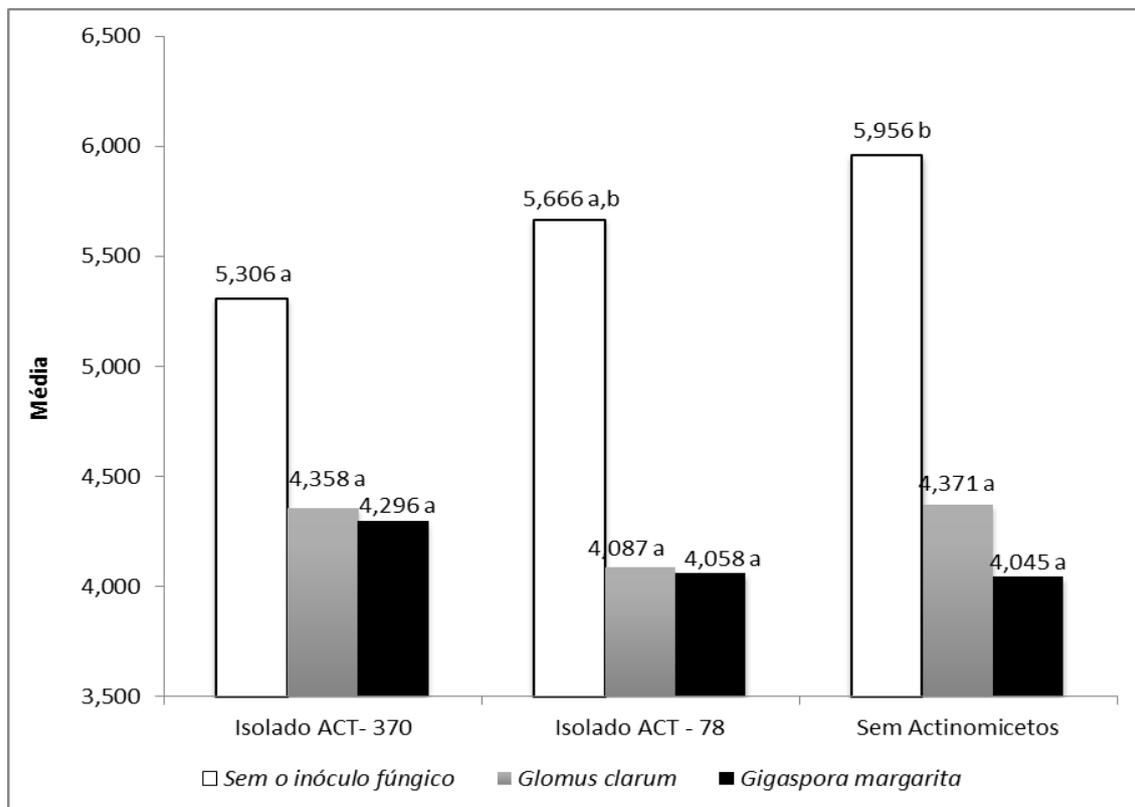
**d) Teores de Magnésio – teor de magnésio na parte aérea (MgPAS), teor de magnésio na raiz (MgRAIZ) e teor total de magnésio na planta (MgTOTAL)**

Os teores de Magnésio na planta estão relacionados, basicamente, às influências das interações, ora dos fatores 1 (FMA) e 3 (actinomicetos) para os teores de magnésio na parte aérea das plantas (Apêndice L), ora dos fatores 1(FMA) e 2 (rizóbio) para os teores de magnésio na raiz e magnésio total, respectivamente (Apêndice M e N). Portanto, as interações entre os fatores 1 e 3 tem mais a ver com a concentração de magnésio na parte aérea da planta (MgPAS), enquanto que a interação entre os fatores 1 e 2 está relacionada às concentrações de Magnésio nas raízes ou à concentração total. As figuras 24 – 29 ilustram as comparações múltiplas das médias dos diferentes teores de magnésio na parte aérea, na raiz e teor total na planta frente aos diferentes fatores experimentais.

Para a interação entre os fatores 1 e 3, observa-se que os teores médios de Magnésio, na parte aérea, para as plantas inoculadas com os actinomicetos “Isolado ACT- 370” (média = 5,306) ou que serviram de testemunha para esse fator (sem inoculação de actinomicetos) com média (= 5,956), são diferentes entre si, considerando somente aquelas plantas sem inoculação de fungos FMA (Figura 25).

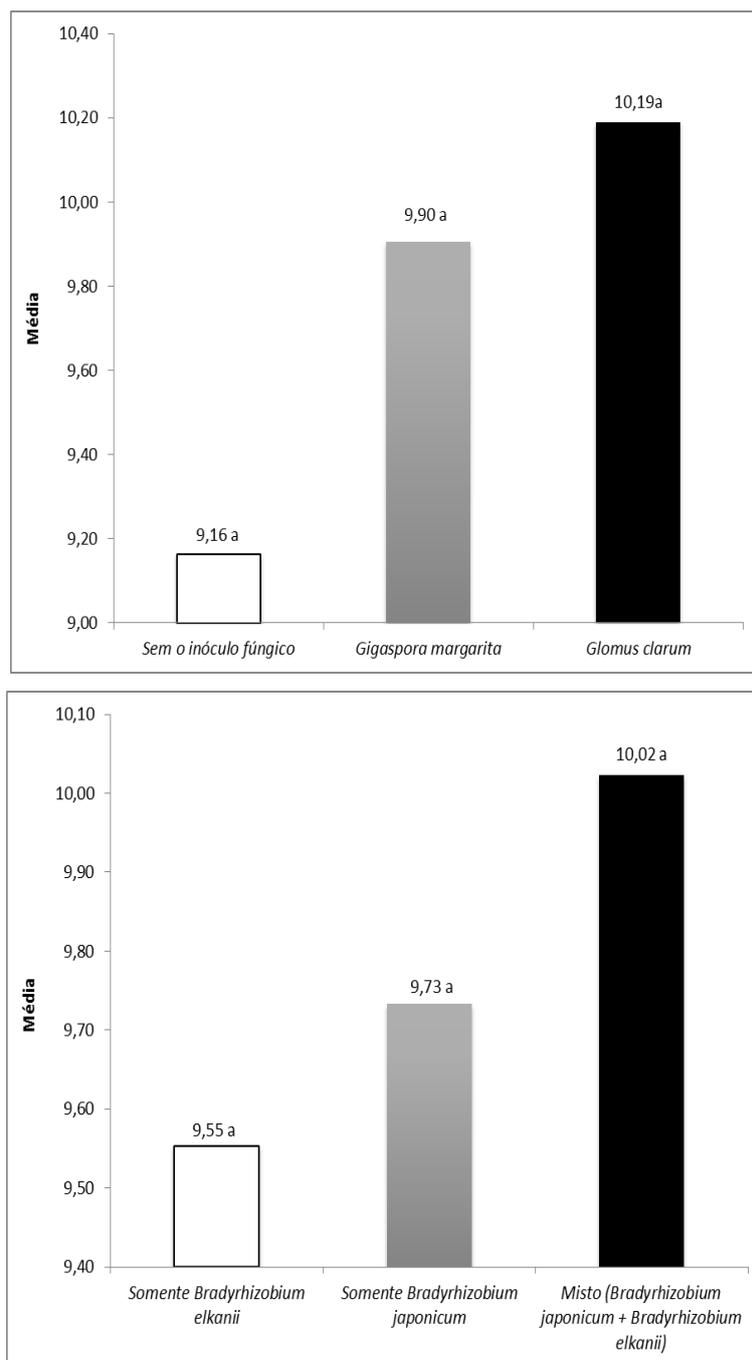


**Figura 24.** Comparações múltiplas das médias da variável MgPAS para os fatores 1 e 3 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de cores diferentes, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

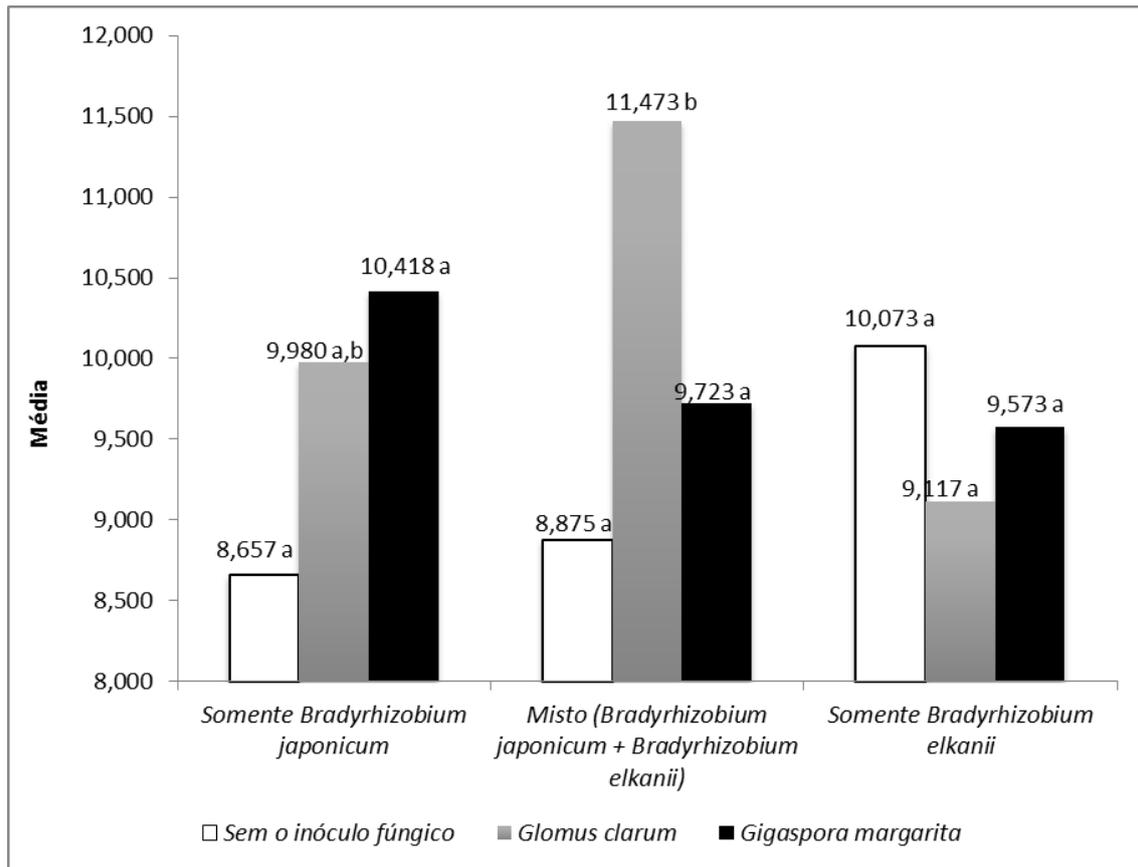


**Figura 25.** Comparações múltiplas das médias da variável MgPAS para a interação entre os fatores 1 e 3 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de mesma cor, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

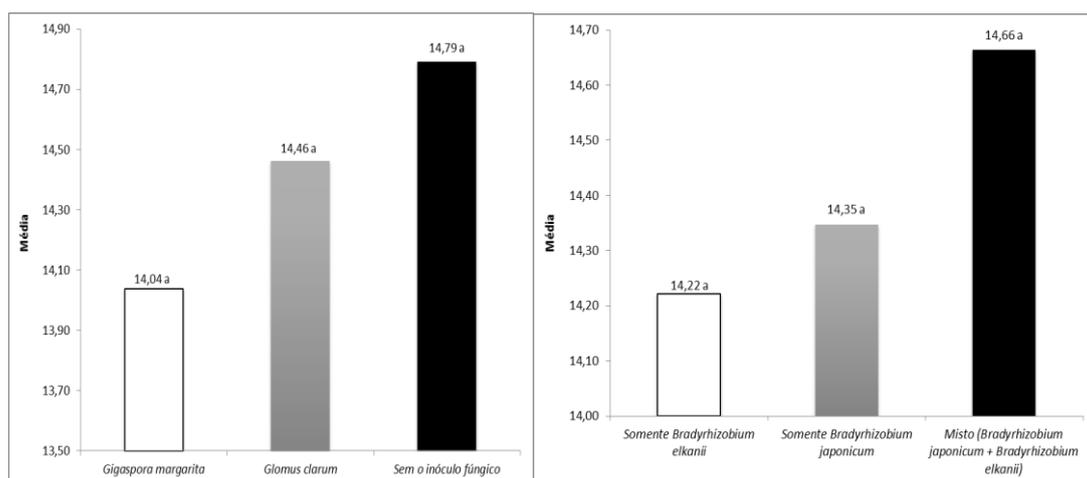
Já para as variáveis MgRAIZ e MgTOTAL, nota-se que as plantas tratadas com os organismos [somente *B. elkani*] e [Misto (*B. japonicum* + *B. elkani*)] apresentaram médias divergentes de concentração para as plantas que receberam o fungo *Glomus clarum* (Figura 27 e 29).



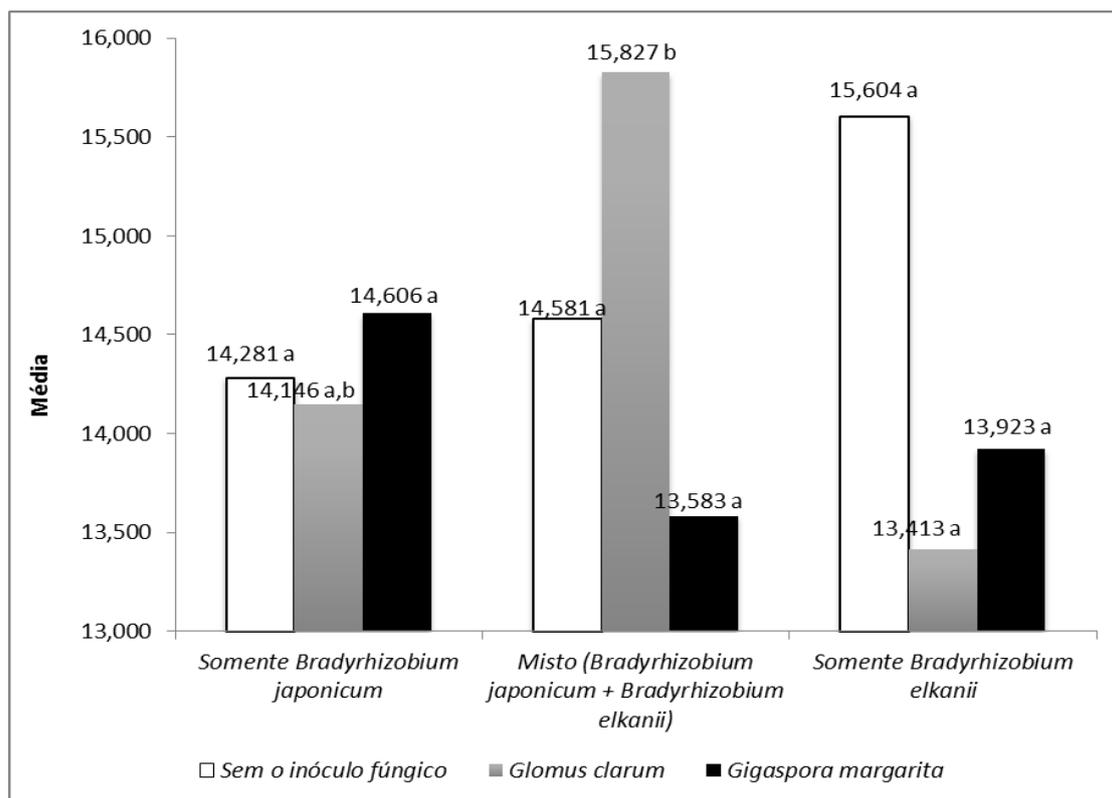
**Figura 26.** Comparações múltiplas das médias da variável MgRAIZ para os fatores 1 e 2 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de cores diferentes, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.



**Figura 27.** Comparações múltiplas das médias da variável MgRAIZ para a interação entre os fatores 1 e 2 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de mesma cor, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.



**Figura 28.** Comparações múltiplas das médias da variável MgTOTAL para os fatores 1 e 2 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de cores diferentes, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.



**Figura 29.** Comparações múltiplas das médias da variável MgTOTAL para a interação entre os fatores 1 e 2 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de mesma cor, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

Analisando as variáveis relacionadas aos aspectos nutricionais, ou seja os teores dos nutrientes P, K, Ca e Mg, na parte aérea, na raiz e no total das plantas de soja, percebe-se que a inoculação simultânea com os isolados de FMA e suas interações com as estirpes de rizóbio e isolados de actinomicetos, influenciou de modo expressivo a dinâmica de absorção de nutrientes pela soja.

Do ponto de vista trófico, tem sido evidenciado que o estabelecimento da micorriza arbuscular tem influenciado a nodulação e a fixação biológica de N<sub>2</sub>, e com o uso do isótopo N<sup>15</sup>, tem sido possível determinar e quantificar o N que é fixado em uma situação particular, bem como a contribuição da simbiose micorrízica para a fixação de N<sub>2</sub>, (BAREA; AZCÓN-AGUILAR; AZCÓN, 1987; 1992; BAREA; AZCÓN; AZCÓN-AGUILAR, 1989; 1992; BAREA et al., 2002). As bases bioquímicas e fisiológicas da interação entre rizóbio e fungos MA em melhorar a produtividade das leguminosas sugere que o principal efeito da micorriza arbuscular em aumentar a atividade do rizóbio se dá através da estimulação

generalizada da nutrição do fitossimbionte, porém alguns efeitos localizados também podem ocorrer ao nível nodular ou da raiz (BAREA; AZCÓN; AZCÓN-AGUILAR, 1992).

A interdependência entre a fixação biológica de nitrogênio e a micorrização de leguminosas parece contribuir para o alto grau de micotrofismo desse grupo de plantas, onde N e P são altamente limitantes para o crescimento normal (SIQUEIRA et al., 1994). A coinoculação múltipla nas leguminosas com fungos MA e rizóbio é muito oportuna e promissora para a produção agrícola nos trópicos (AHMAD, 1995; FRANCO et al., 1992; FRANCO et al., 1994; SILVA et al., 1996).

A fixação biológica de  $N_2$  é um processo que tem um custo energético elevado. Isto implica que apresenta uma elevada demanda de P, em forma de ATP, o que leva a se pensar que o suprimento de P por parte da micorriza MA, se expressa como um estímulo a FBN devido a um aumento na atividade da nitrogenase dentro dos nódulos. Isto tem sido explicado em situações diversas e em uma ampla variedade de leguminosas (AZCÓN-AGUILAR; BAREA, 1992; BAREA; AZCÓN-AGUILAR, 1983; HAYMAN, 1986). Segundo Azcón-Aguilar e Barea, (1996) a resposta mais frequente a micorrização é traduzida em um incremento na biomassa de nódulos, na atividade da nitrogenase, no conteúdo de leghemoglobina, e na concentração e/ou conteúdo de nitrogênio na planta (KUCEY; PAUL, 1982). Estes efeitos se justificam fundamentalmente através dos benefícios advindos do incremento generalizado da nutrição de fósforo na planta. Geralmente, os nódulos tem uma cocentração de P duas ou três vezes superior a das raízes sobre as quais se formam (MOSSE, 1977). De acordo com os resultados neste experimento, percebe-se que a inoculação com os isolados de FMA influenciaram significativamente os teores de P na raiz e no total das plantas.

Em solos de cerrado, Paula; Siqueira e Hoshika (1990) evidenciaram que diferentes populações de fungos micorrízicos mostraram diferenças na taxa de colonização, de absorção de P, de produção de matéria seca da parte aérea, e de produção de grãos da soja. Nessa cultura de grande importância agrícola, além dos benefícios diretos, existem efeitos positivos na interação fungo micorrízico-rizóbio, que resultam da melhor nutrição de P, necessária

para a nodulação e a fixação biológica de N (PAULA; SIQUEIRA, 1987; VEJSADOVA et al., 1992).

Embora os experimentos com interações micorrízicas VA tenham sido centralizados em seus efeitos na absorção de P, estudos evidenciam que esta simbiose pode favorecer a absorção de outros nutrientes. Neste experimento, a presença de FMA não influenciou de modo isolado os teores de K na parte aérea das plantas, porém, interagindo com outros micro-organismos, no caso específico, quando *G. margarita* esteve presente junto com *B. Japonicum* (BR 33), ou quando esteve presente junto com o isolado ACT-370, os teores de K na parte aérea das plantas foram maiores. Bressan et al. (2001), verificaram que a inoculação de fungos micorrízicos contribuiu para o aumento da matéria seca, produção de grãos e para os teores dos nutrientes N, P, K, Zn e Cu no sorgo e na soja. Estes efeitos são dependentes das doses de P no solo e da espécie de fungos micorrízicos inoculados.

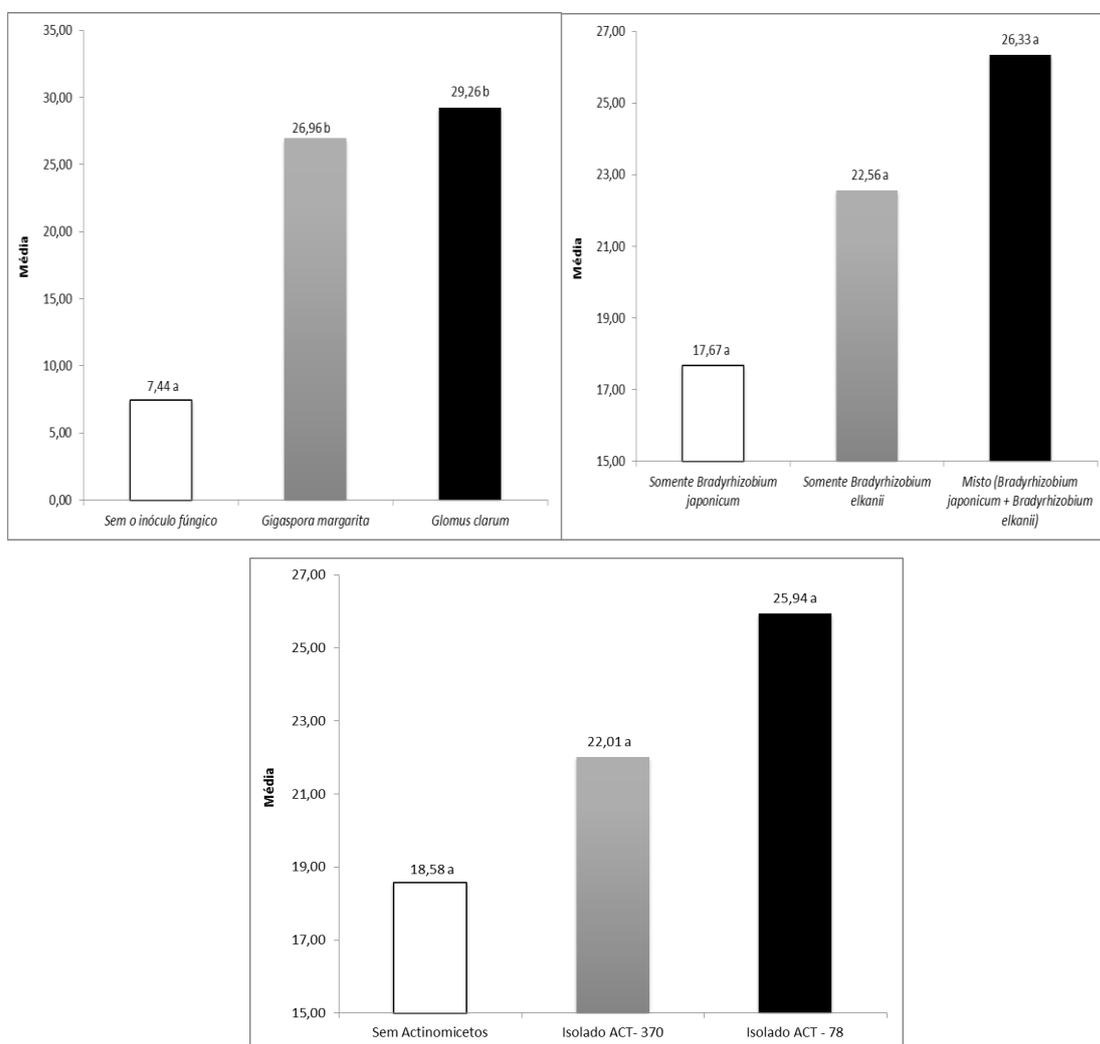
#### **4.2.2.4. Densidade de Actinomicetos na Rizosfera de Soja (DARS) – expressa em UFC/g raiz.**

A modelagem da variável DARS envolveu a participação das interações entre os fatores 1 e 2; e 1 e 3 (Apêndice O), sendo os tratamentos contendo somente *B. japonicum* e inóculo misto [*B. japonicum* + *B. elkanii*] os que produziram médias diferentes para as plantas inoculadas com o fungo “*Glomus clarum*”, o que representa a interação Fator1\*Fator2 (Figura 31); já as plantas tratadas com “Isolado ACT – 78” e “sem actinomicetos” também apresentaram médias de DARS distintas para as plantas de soja que receberam a inoculação do fungo “*Gigaspora margarita*” (Figura 32), o que representa a interação Fator1\*Fator3.

Portanto, constata-se uma influência dos isolados de FMA *G. margarita* e *G. clarum* na densidade populacional de actinomicetos na rizosfera de soja cv. Seridó (Figura 30, 31 e 32). Este efeito se torna mais significativo na interação entre o isolado FMA de *G. clarum* mais a mistura de rizóbio (BR33-*B. japonicum* + BR 29-*B. elkanii*) – (Figura 31) e na interação entre o FMA *G. margarita* e o isolado de actinomiceto ACT-78 (Figura 32) em relação às plantas que não receberam actinomicetos, para essa variável analisada.

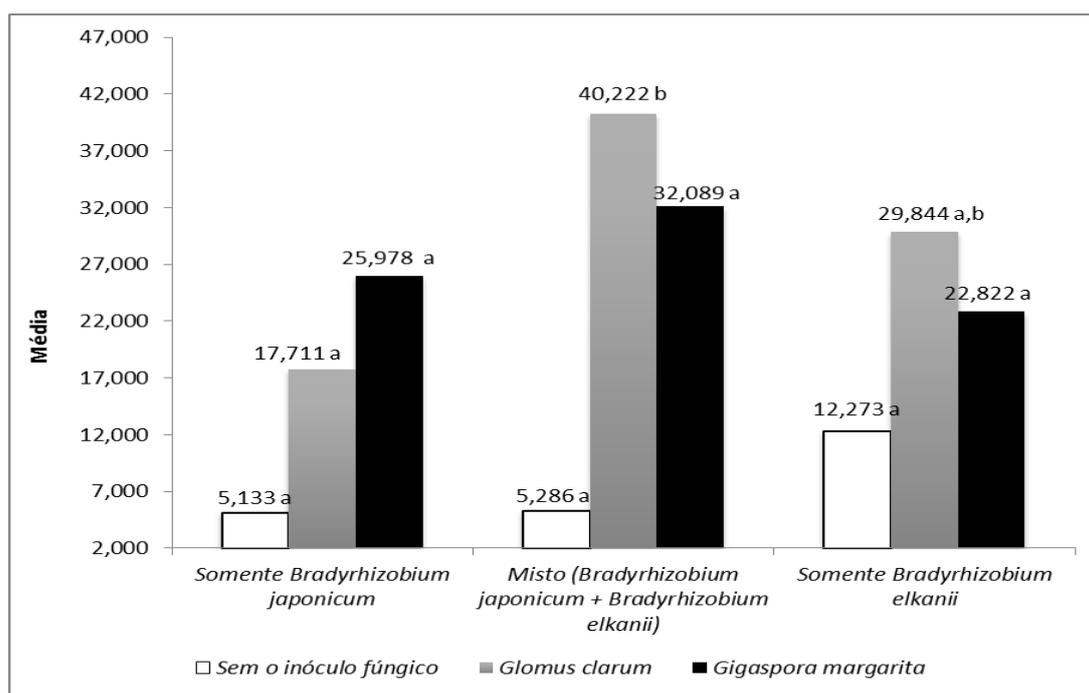
De acordo com Cardoso e Nogueira (2007) a presença de microrganismos na rizosfera pode aumentar a exsudação radicular. Microrganismos como o rizóbio e fungos micorrízicos que são simbióticos, aumentam quantitativa e qualitativamente a exsudação, visto que esses microrganismos influenciam diretamente o crescimento da planta e, portanto, sua fisiologia (ANDRADE, 1999).

Os fungos micorrízicos arbusculares e microrganismos na rizosfera podem influenciar seu mútuo desenvolvimento e exercer efeitos combinados sobre o crescimento das plantas (MEYER; LINDERMAN, 1986 a, b).

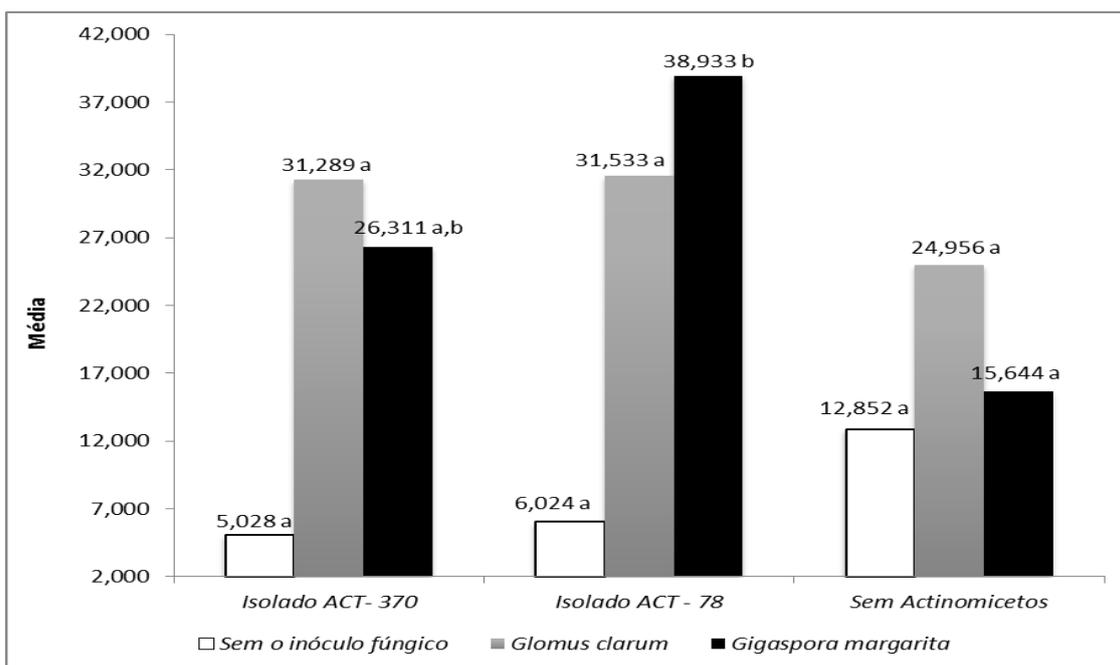


**Figura 30.** Comparações múltiplas das médias da variável DARS para os fatores 1, 2 e 3 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de cores diferentes, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

A inoculação dos isolados de FMA influenciou de modo significativo a densidade de actinomicetos na rizosfera das plantas de soja, ou seja, o estabelecimento de uma micorrizosfera. Isto é constatado por vários autores que mostram que o estabelecimento da micorriza arbuscular confere mudanças tanto quantitativa quanto qualitativa nas populações microbianas na rizosfera ou micorrizosfera (AZCÓN; BAREA, 1996; AZCÓN-AGUILAR; BAREA, 1992, 1996). Mudanças qualitativas na comunidade microbiana da rizosfera induzida pelos FMA podem ser causada por efeitos indiretos na fisiologia do hospedeiro e mudanças na exsudação das raízes (MEYER; LINDERMAN, 1986b) ou exsudatos fúngicos (PAULITZ; LINDERMAN, 1989). Raimam et al., (2007) constataram que a presença do FMA *Glomus clarum* estimulou a população de bactérias fixadoras de nitrogênio em arroz.



**Figura 31.** Comparações múltiplas das médias da variável DARS para a interação entre os fatores 1 e 2 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de mesma cor, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.



**Figura 32.** Comparações múltiplas das médias da variável DARS para a interação entre os fatores 1 e 3 do experimento 2. Médias seguidas de mesma letra entre colunas de mesma cor, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

Grande número de bactérias, actinomicetos e fungos são encontrados formando interações e associados a estruturas do fungo MA. Aspecto interessante neste sentido, é que algumas bactérias *Pseudomonas* aderem à hifa micorrízica que parece ser um veículo para a colonização da raiz por estas bactérias (BIANCIOTTO et al., 2000). As hifas externas dos FMA também podem servir de substrato microbiano, sendo consumidas (ANDRADE, 1999) ou ainda os esporos podem ser parasitados, perdendo sua viabilidade (SIQUEIRA et al., 1984). Bianciotto et al. (2001), descreveram, polissacarídeos extracelulares envolvidos na adesão de *Azospirillum* e *Rhizobium* na estrutura micorrízica.

### 4.3. EXPERIMENTO III

A apresentação dos resultados segue a mesma sistemática, ou seja, primeiro os resultados provenientes de uma análise descritiva e exploratória e depois os resultados provenientes da análise de variância, dessa vez aplicada a um experimento com delineamento inteiramente casualizado.

Na Tabela 8 tem-se os valores do tamanho da amostra, da média e desvio padrão para as variáveis medidas para o experimento 3 (experimento com apenas um fator e 5 réplicas).

De acordo com a TABELA 8, percebe-se que houve diferenças estatísticas para as seguintes variáveis: biomassa de parte aérea seca, teores de potássio na parte aérea, na raiz e total e teores de magnésio na parte aérea de plantas de soja. Com base nesses resultados, constata-se que a coinoculação da mistura de FMA + ACT 78 e mistura de FMA + ACT-370 em plantas de soja, conferiu maior biomassa de parte aérea seca e maior teor de magnésio na parte aérea em relação às plantas que receberam um coquetel de inóculo misto envolvendo todos os micro-organismos estudados.

Um resultado interessante está relacionado aos teores médios de potássio, ou seja, a coinoculação da soja com o coquetel com todos os micro-organismos influenciou de modo significativo tais teores nas plantas em relação aquelas em que recebeu a coinoculação de FMA com os isolados de actinomicetos. Isto é um forte indicador que a presença das estirpes de rizóbio no coquetel de inóculo influenciou nos teores elevados de potássio nessas plantas.

Além de melhorar a absorção de P pelas plantas, os FMA podem favorecer a absorção de outros nutrientes. Pereira (1995) detectou que plantas de acerola inoculadas com FMA na fase de semeadura acumularam mais N, P e K na parte aérea do que as plantas não micorrizadas. Mosse (1957), constatou em plântulas de maçã micorrizadas teores mais elevados de potássio, cálcio, magnésio, ferro, manganês e cobre em relação ao controle sem micorriza. Sieverding e Toro (1988) mostraram que a absorção de K em solos deficientes está relacionada com espécies de FMA, de forma a indicar que o K pode ser transportado por hifas desses fungos.

**Tabela 8.** Estatísticas descritivas para as variáveis de entrada do estudo, segundo os tratamentos do experimento 3.

Variáveis	Mistura de Micro-organismos									Total			Comparação dos Tratamentos (Valor-p)
	Mistura de FMA + Act 370			Mistura de FMA + Act 78			(Mistura de FMA) + (Mistura Act) + (Mistura Rizobium)						
	n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP	
BPAS	5	3,65 <sup>B</sup>	0,53	5	3,62 <sup>B</sup>	0,39	5	2,85 <sup>A</sup>	0,60	15	3,37	0,61	0,0481 <sup>(*)</sup>
BRS	5	0,73 <sup>A</sup>	0,27	5	0,68 <sup>A</sup>	0,16	5	0,52 <sup>A</sup>	0,11	15	0,64	0,20	0,2564
BPAS/BRS	5	5,53 <sup>A</sup>	1,68	5	5,48 <sup>A</sup>	0,82	5	5,46 <sup>A</sup>	0,63	15	5,49	1,05	0,9953
Fósforo na Parte Aérea	5	0,81 <sup>A</sup>	0,11	5	0,87 <sup>A</sup>	0,10	5	0,96 <sup>A</sup>	0,17	15	0,88	0,14	0,2385
Fósforo na Raiz	5	1,09 <sup>A</sup>	0,15	5	1,08 <sup>A</sup>	0,14	5	1,02 <sup>A</sup>	0,09	15	1,06	0,12	0,6424
Fósforo Total	5	1,90 <sup>A</sup>	0,22	5	1,95 <sup>A</sup>	0,22	5	1,98 <sup>A</sup>	0,22	15	1,94	0,21	0,8511
Potássio na Parte Aérea	5	9,45 <sup>A</sup>	0,76	5	9,85 <sup>A</sup>	0,89	5	12,50 <sup>B</sup>	0,43	15	10,60	1,55	0,0000 <sup>(*)</sup>
Potássio na Raiz	5	5,65 <sup>A</sup>	0,91	5	5,55 <sup>A</sup>	0,93	5	9,85 <sup>B</sup>	1,83	15	7,02	2,40	0,0002 <sup>(*)</sup>
Potássio Total	5	15,10 <sup>A</sup>	1,22	5	15,40 <sup>A</sup>	1,63	5	22,35 <sup>B</sup>	1,82	15	17,62	3,76	0,0000 <sup>(*)</sup>
Cálcio na Parte Aérea	5	10,06 <sup>A</sup>	1,41	5	9,58 <sup>A</sup>	0,96	5	8,11 <sup>A</sup>	1,29	15	9,25	1,43	0,0685
Cálcio na Raiz	5	5,55 <sup>A</sup>	0,72	5	4,57 <sup>A</sup>	0,67	5	4,72 <sup>A</sup>	0,37	15	4,95	0,72	0,0508
Cálcio Total	5	15,61 <sup>A</sup>	1,98	5	14,15 <sup>A</sup>	1,27	5	12,83 <sup>A</sup>	1,58	15	14,20	1,92	0,0589
Magnésio na Parte Aérea	5	5,48 <sup>B</sup>	0,32	5	5,10 <sup>B</sup>	0,45	5	4,23 <sup>A</sup>	0,37	15	4,94	0,65	0,0007 <sup>(*)</sup>
Magnésio na Raiz	5	8,59 <sup>A</sup>	1,94	5	8,92 <sup>A</sup>	2,21	5	9,77 <sup>A</sup>	2,12	15	9,09	2,00	0,6642
Magnésio Total	5	14,07 <sup>A</sup>	2,01	5	14,02 <sup>A</sup>	2,12	5	13,99 <sup>A</sup>	2,05	15	14,03	1,91	0,9982
DARS <sup>1</sup>	5	1,133 <sup>A</sup>	1,97	5	1,147 <sup>A</sup>	2,15	5	1,188 <sup>A</sup>	2,08	15	11,56	1,93	0,9093

<sup>(\*)</sup> Teste (ANOVA) significativo ao nível de 5%; (1) a densidade de actinomicetos é expressa em UFC/g solo rizosférico = UFC x 10<sup>5</sup>. Então, tem-se (1,13 x 10<sup>5</sup>; 1,14 x 10<sup>5</sup> e 1,18 x 10<sup>5</sup>, respectivamente), para os valores médios da variável DARS na última linha da Tabela.

## 5. CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado este trabalho e de acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir:

1. No experimento I:
  - a. Os dois isolados de actinomicetos (*Streptomyces*) estudados colonizaram e foram recuperados na rizosfera da soja cv. Seridó.
  - b. Não houve resposta significativa quanto à biomassa de matéria seca de raiz e a biomassa de matéria seca de parte aérea das plantas em resposta à coinoculação de isolados de actinomicetos e de estirpes de *Bradyrhizobium* spp.
  - c. A inoculação dos isolados de actinomicetos influenciou a nodulação da soja. O isolado de actinomiceto ACT-78 promoveu uma maior nodulação quando coinoculado com a estirpe BR33, mas reduziu significativamente a nodulação da estirpe BR29, enquanto que o isolado ACT-370 proporcionou uma maior nodulação junto a BR29 e diminuiu a nodulação da BR33.
2. No experimento II:
  - a. A inoculação isolada de fungos micorrízicos *G. margarita* e *G. clarum* influenciou de modo significativo a biomassa de parte aérea seca (BPAS) e de raiz seca (BRS), a relação entre BPAS/BRS, número de nódulos, biomassa de nódulos secos, teores de fósforo na parte aérea seca, na raiz seca e no total da planta e a densidade de actinomicetos na rizosfera de soja.
  - b. A inoculação isolada do fungo micorrízico *G. clarum* proporcionou uma maior biomassa de nódulos secos e também maiores teores de fósforo na parte aérea seca, na raiz seca e no total da planta de soja do que a inoculação isolada do FMA *G. margarita*.
  - c. A estirpe BR 29 de *Bradyrhizobium elkanii* quando inoculada sozinha e o isolado ACT-370 de *Streptomyces* proporcionaram um número maior de nódulos.
  - d. Os fungos micorrízicos arbusculares apresentaram efeito estimulatório no acúmulo de biomassa vegetal de parte aérea seca e na relação entre biomassa de parte aérea seca e

biomassa de raiz seca, na presença das estirpes de *Bradyrhizobium*.

- e. Constataram-se efeitos sinérgicos do fungo micorrizico arbuscular *Glomus clarum*, do isolado ACT-370 de *Streptomyces* e dos rizóbios na biomassa de nódulos secos.
  - f. Houve efeito antagônico (negativo) do isolado ACT-78 na biomassa de nódulos secos.
  - g. Houveram efeitos sinérgicos dos fungos micorrizicos arbusculares, dos isolados de *Streptomyces* e dos rizóbios influenciando os teores de nutrientes minerais em plantas e a densidade de actinomicetos na rizosfera de soja.
  - h. Houveram efeitos antagônicos do isolado ACT-78 e da estirpe BR 29 de *Bradyrhizobium elkanii* na influência de teores de fósforo na parte aérea de plantas de soja.
  - i. A inoculação isolada de fungos micorrízicos arbusculares não influenciou os teores de potássio nas plantas, mas influenciou os teores de cálcio e de magnésio na raiz.
3. No experimento III:
- a. A inoculação simultânea dos fungos micorrízicos arbusculares e actinomicetos influenciou os teores de magnésio e uma maior biomassa de parte aérea seca de plantas.
  - b. A inoculação de um coquetel contendo os fungos micorrízicos arbusculares, os isolados de actinomicetos e as estirpes de rizóbio, influenciou teores mais elevados de potássio em plantas de soja.
  - c. Constataram-se efeitos sinérgicos dos fungos micorrízicos arbusculares, dos actinomicetos e dos rizóbios. O que abre perspectivas para futuras pesquisas, para um maior aprofundamento dessas interações rizosféricas e o que de benefício pode acarretar para a sustentabilidade da agricultura moderna.

## 6. REFERÊNCIAS

AHMAD, M. H. Compatibility and Coselection of VAM Fungi and Rhizobia for Tropical Legumes. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.15, p.229-39, 1995.

ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. 2. ed. New York, J. Wiley, p,467 1977.

ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, v.252, p.1-9, 2003.

ALVES, B.; J.; R. LINCOLN, Z. FERNANDES, F.; M. HECKLER, J.; C. MACEDO, R.; A. T. BODDEY, R.; M. JANTALIA, C.; P. URQUIAGA, S. Fixação biológica de nitrogênio e fertilizantes nitrogenados no balanço de nitrogênio em soja, milho e algodão. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.41, n.3, p.449-456, mar. 2006.

AMES, R. N. Mycorrhiza development in onion in response to inoculation with chitin-decomposing actinomycetes. **New Phytol.** v.112, p.423-427, 1989.

AMES, R. N.; BETHLENFALVAY, G. Localized increase in nodule activity but no competitive interaction of cowpea rhizobia due to pre-establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza. **New Phytol.** v.106, 207 – 215, 1987b.

AMES, R. N.; MIHARA, K. L. BETHLENFALVAY, G. J. The establishment of microorganisms in vesicular-arbuscular mycorrhizal and control treatments. **Biology and Fertility of Soils.** v.3, p,217-223, 1987.

AMES, R. N.; REID, C. P. P.; INGHAM, E. R. Rhizosphere bacterial population responses to root colonization by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. **New Phytol.** v.96, p.555-563. 1984.

AMES, R. N; BETHLENFALVAY, G. J. Mycorrhizal fungi and the integration of plant and soil nutrient dynamics. **Journal of Plant Nutrition** v.10, n.9-16,p.1313-1321. 1987a.

AMES, R. N; MIHARA, K. L; BAYNE, H. G. Chitin-decomposing actinomycetes associated with a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus from a calcareous soil. **New Phytol.** v.111, p.67-71, 1989.

ANDRADE, D. S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S., eds. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília, Embrapa-SPI, p.63-94, 1994.

ANDRADE, G. Interacciones microbianas en la rizosfera. In: SIQUIERA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIM, V.; FURTINI-NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Eds.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras, Departamento de ciência do Solo, p. 551-575, 1999.

ANDRADE, G.; LINDERMAN, R. G.; BETHLENFALVAY, G. J. Bacterial associations with mycorrhizosphere and hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Plant Soil**, v.202, p.79-87, 1998.

ANDRADE, G.; MIHARA, K. L.; LINDERMAN, R. G.; BETHLENFALVAY, G. J. Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi. **Plant Soil**, v.192, p.71-79, 1997.

ANDRADE, G.; NOGUEIRA, M. A. Bioindicadores para uma análise de risco ambiental: organismos geneticamente modificados e grupos funcionais de microrganismos do solo. **Biotec. Ci. Desenv.**, v.34, p.11-19, 2005.

ARAÚJO, F. F. Rizobactérias e indução de resistência a doenças em plantas. Parte II - Microrganismos promotores de crescimento em plantas. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. **Microrganismos e agrobiodiversidade: O novo desafio para agricultura**. Guaíba, Agrolivros. p.197-210, 2008.

ARTURSSON, V.; FINLAY, R. D.; JANSSON, J. K. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. **Environmental Microbiology**, v.8, p.1-10, 2006.

ASSUMPÇÃO, L. C.; LACAVA, P. T.; DIAS, A. C. F.; AZEVEDO, J. L.; MENTEN, J. O. M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.44, n.5, p.503-510, 2009.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology**, fundamentals and applications. 3. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 562 p, 1993.

AUER, C. G.; SILVA, R. Fixação de nitrogênio em espécies arbóreas. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do Solo. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**. p.157-172, 1992.

AZCÓN, C.; BAREA, J. Interacciones de las micorrizas arbusculares con microorganismos de la rizosfera. In: GUERRERO, E. (Ed.). **Micorrizas: recurso biológico del suelo**. Bogotá: Fondo FEN, p. 47-68, 1996.

AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J. M. Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms. En: ALLEN, F. (Ed.). **Mycorrhizal Functioning an: Integrative Plant-Fungal Process**. Nueva York, Chapman & Hall, p. 163 – 198, 1992.

AZCÓN-AGUILAR, C; BAREA, J. M. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens. An overview of the mechanisms involved. **Mycorrhiza**, v. 6, n. 6, p. 457–464, 1996.

BAGYARAJ, D. J. Biological Interactions with VA Mycorrhizal Fungi. In: Powell, C. L. & Bagyaraj, D. J. **VA Mycorrhiza**. Boca Raton, CRC Press, p. 131-53, 1984.

BALOTA, E.; L. LOPES, E. S.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. Interações e efeitos fisiológicos de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, n.11, p.1335-1345, nov. 1995.

BAREA J. M. Rhizosphere and mycorrhiza of field crops. In: BALA´ZS, E; GALANTE, E; LYNCH, J. M.; SCHEPERS, J. S.; TOUTANT, J. P.; WERNER, D.; WERRY, P. (Eds.). **Biological resource management: connecting science and policy**. Berlin, Heidelberg, New York: INRA Editions, Springer-Verlag, p. 110–125, 2000.

BAREA, J. M.; AZCON, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungi in Nitrogen-fixing Systems. In: NORRIS, J. R.; READ, D. VARMA, A.K. **Techniques for Mycorrhizal Research**. Academic Press, San Diego, 1994.

BAREA, J. M.; AZCÓN - AGUILAR, C. Interaction between mycorrhizal fungi and soil microorganisms. In: GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI - PEARSON, V.; TROUVELOT, A. **Les mycorrhizes: biologie et utilization**, INR. Paris, p.181 - 93. 1982.

BAREA, J. M.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria. In: VARMA, A.; ABBOTT, L.; WERNER, D.; HAMPP, R. (Eds.). **Plant surface microbiology**. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, p. 351–371, 2004.

BAREA, J. M.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. **Antonie van**

**Leeuwenhoek: International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 81, p. 343–351, 2002.

BAREA, J. M.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Time-course of N<sub>2</sub>-fixation (15N) in the field by clover growing alone or in mixture with ryegrass to improve pasture productivity, and inoculated with vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.112, p. 299–404, 1989.

BAREA, J. M.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi in nitrogen-fixing systems. In: NORRIS, J. R.; READ, D. J.; VARMA, A. K. (Eds.). **Methods in microbiology**. London: Academic Press, 391–416, 1992.

BAREA, J. M.; AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. En: BRADY, N. C. (Ed.). **Advances in Agronomy**. Nueva York, Academic Press, v.36, p. 1 – 54, 1983.

BAREA, J. M.; AZCÓN-AGUILAR, C.; AZCÓN, R. Mycorrhiza and crops. In: TOMMERUP, I. C. (Ed.). **Advances in plant pathology. Mycorrhiza: A synthesis**. Academic, New York. 1992.

BAREA, J. M.; AZCÓN-AGUILAR, C.; AZCÓN, R. Vesicular–arbuscular mycorrhiza improve both symbiotic N<sub>2</sub>-fixation and N uptake from soil as assessed with a <sup>15</sup>N technique under field conditions. **New Phytologist**. v.106, p.717–721, 1987.

BAREA, J. M.; POZO, M. J.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n.417, p. 1761–1778, 2005.

BAREA, J. M.; TORO, M.; OROZCO, M. O.; CAMPOS, E.; AZCÓN, R. The application of isotopic <sup>32</sup>P and <sup>15</sup>N-dilution techniques to evaluate the interactive effect of phosphate-solubilizing rhizobacteria, mycorrhizal fungi and Rhizobium to improve the agronomic efficiency of rock phosphate for legume crops. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**. v.63, p.35–42, 2002.

BATAGLIA, O. C.; FURLANI, A. M. C.; TEIXEIRA, J. P. F.; FURLANI, P. R.; GALLO, J. R. Métodos de análise química de plantas. **B. Técn. Inst. Agron.** Campinas, SP, n. 78, 94 p, 1983.

BECKING, J. H. Endophyte and association establishment in non-leguminous nitrogen-fixing plants. In: **Recent developments in nitrogen fixation**. New York, Academic Press, p. 551-568, 1977.

BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F. A.; FONSECA, H. M. A. Fungos Micorrízicos Arbusculares: muito além da nutrição. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa, MG: SBCS, 2006.

BHATTACHARJEE, M.; MUKERGI, K. G.; TEWARI, J. P.; SKOROPAD, W. P. Structure and hyperparasitism of a new species of *Gigaspora*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 78, n. 1, p. 184 – 188, 1982.

BHOWMIK, S.N.; SINGH, C.S. Mass multiplication of AM inoculums: effect of plant growth-promoting rhizobacteria and yeast in rapid culturing of *Glomus mosseae*. **Current Science**, v.86, p.705-709, 2004.

BIANCIOTTO V.; BONFANTE P. Arbuscular mycorrhizal fungi a specialized niche for rhizospheric and endocellular bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek: International Journal of General and Molecular Microbiology**, v.81, p.365–371, 2002.

BIANCIOTTO V.; PEROTTO S.; RUIZ-LOZANO J. M.; BONFANTE P. Arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria: from cellular investigations to biotechnological perspectives. In: GIANINAZZI, S.; SCHÜEPP, H.; BAREA, J. M.; HASELWANDTER, K. (eds). **Mycorrhizal technology in agriculture: from genes to bioproducts**. Basel, Switzerland: Birkha user Verlag, p.19–31. 2002.

BIANCIOTTO, V.; ANDREOTTI, S.; BALESTRINI, R.; BONFANTE, P.; PEROTTO, S. Mucoïd mutants of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 show increased ability in biofilm formation on mycorrhizal and nonmycorrhizal carrot roots. **Mol. Plant. Microbe Interac.** v14. p.255–260, 2001.

BIANCIOTTO, V.; BANDI, C.; MINERDI, D.; SIRONI, M.; TICHY, H. V. An obligately endosymbiotic fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 62, p. 3005–3010, 1996.

BIANCIOTTO, V.; LUMINI, E.; LANFRANCO, L.; MINERDI, D.; BONFANTE, P.; PEROTTO, S. Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the family Gigasporaceae. **Appl. Environ. Microbiol.** v.66, p.4503–4509, 2000.

BIRÓ, B.; KOVES-PECHY, K.; VORS, I.; TAKACS, T.; EGGENBERG, P.; STRASSER, R. J. Interrelations between *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers and arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of alfalfa in sterile, AMF-free or normal soil conditions. **Applied Soil Ecology**, v.15, p.159-168, 2000.

BIZARRO, M. J.; GIONGO, A; VARGAS, L. K; ROESCH, L. F. W.; GANO, K. A.; ENILSON LUIZ SACCOL DE SÁ, E. L. S.; PASSAGLIA, L. M. P.; SELBACH, P. A. Genetic variability of soybean bradyrhizobia populations under different soil managements. **Biol. Fertil. Soils**, v. 47, n. 3, p. 357-362, 2011.

BODDEY, L. H.; HUNGRIA, M. Phenotypic grouping of Brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. **Biol. Fertil. Soils**, v.25, n. 4, p. 407–415, 1997.

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

BOWEN, G. D.; ROVIRA, A. D. The rhizosphere and its management to improve plant growth. **Advances in Agronomy**, v. 66, p. 1–102, 1999.

BRESSAN, W.; SIQUEIRA, J. O.; VASCONCELLOS, C. A.; PURCINO, A. A. C. Fungos micorrízicos e fósforo, no crescimento, nos teores de nutrientes e na produção do sorgo e soja consorciados. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 315-323, 2001.

BUSCOT, F. What are soils? In: BUSCOT, F, VARMA, S. (Eds.). **Microorganisms in soils: roles in genesis and functions**. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, p. 3–18, 2005.

CARDOSO, E. J. B. N. Ecologia microbiana do solo. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Soc. Br. C. do Solo. p.32-39, Campinas,SP. 1992.

CARDOSO, E. J. B. N.; NOGUEIRA, M. A. A Rizosfera e seus efeitos na comunidade microbiana e na nutrição de plantas. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. (Eds.) **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 79 – 96, 2007.

CARDOSO, I. M.; KUYPER, T. W. Mycorrhizas and tropical soil fertility. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v.116, p.72–84, 2006.

CARPENTER-BOGGS, L.; LOYNACHAN, T. E.; STAHL, P. D. Spore germination of *Gigaspora margarita* stimulated by volatiles of soil-isolated actinomycetes. **Soil Biol. Biochem.** v.27. n,11, p.1445-1451. 1995.

CERVANTESS, E.; RODRÍGUEZ-BARRUECO, C. Relationships between the Mycorrhizal and Actinorhizal Symbiosis in Non-legumes. In: NORRIS, J.R.; READ, D.; VARNA, A.K. **Techniques for Mycorrhizal Research**. Academic Press, San Diego. 1994.

CHAUHAN, P. S.; CHAUDHRY, V.; MISHRA, S.; NAUTIYAL, C. S. Uncultured bacterial diversity in tropical maize (*Zea mays* L.) rhizosphere. **Journal of Basic Microbiology**, v. 51, p. 15–32, 2011.

COELHO, R. R. R.; DROZDOWICZ, A. the occurrence of actinomycetes in a cerrado soil in Brazil. **Révue d'Ecologie et de Biologie du Sol**, Paris, v. 15, p. 459 – 473, 1978.

COLEMAN, D. C. Through a ped darkly: an ecological assessment of root-soil-microbial-faunal interactions. In: FITTER, A. H.; ATKINSON, A. H.; READ, D. J.; USHER, M. B. (Eds.). **Ecological interactions in Soil**. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 1-22, 1985.

DANIELS, B. A.; MENGE, J. A. Hyperparasitism of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Phytopatol.** v.70, p.584-588. 1980.

DANIELS-HYLTON, K. D. M.; AHMAD, M. H. Inoculation response in kidney beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) to vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia in non-sterilized soil. **Biol. Fertile. Soils**, v.18, p.95 – 98, 1994.

DE-POLLI, H.; NEVES, M. C. P. Aplicabilidade da fixação biológica de nitrogênio na faoagricultura tropical. In: Solo-Suelo/96, Águas de Lindóia, SP, 1996.

FAO, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Technology of production of edible flours and protein products from soybeans. **FAO service bulletin 97**, 1992.

FIGUEIREDO, M. V. B.; LIRA JÚNIOR, M. A.; ARAÚJO, A. S. F.; SILVEIRA, J. A. G. Fatores bióticos e abióticos à fixação biológica de N<sub>2</sub>. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. (Org.). **Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura**. Guaíba: Agrolivros, p. 39-64, 2008.

FITTER, A. H.; GARBAYE, J. Interactions between mycorrhizal fungi and other soil organisms. **Plant Soil**. 159: 123-132. 1994.

FRACCHIA, S.; SAMPEDRO, I.; SCERVINO, J. M.; GARCÍA-ROMERA, I.; OCAMPO, J. A.; GODEAS, A. Influence of saprobe fungi and their exudates on arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Symbiosis**, v. 36, p. 169–182, 2004.

FRANCO, A A; CAMPELLO, E. F. C.; DIAS, L. E.; FARIA, S. M. Revegetation of acidic residues from bauxita mining using nodulated and mycorrhizal legume trees. **Proc. Nitrogen Fixing Trees for Acid Soil**. Turrialba, Costa Rica, July, 3-8, p. 313-320, 1994.

FRANCO, A. A.; CAMPELO, E. F.; SILVA, E. M. R.; FARIA, S. M. **Revegetação de solos degradados**. Seropédica. Brasília: EMBRAPA-CNPBS, (EMBRAPA-CNPBS. Comunicado Técnico, 9), 1992.

FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J. Especificidade hospedeira na simbiose com *Rhizobium* – feijão e influência de diferentes nutrientes. **Pesq. Agrop. Bras.** v.2, p.467-474, 1967.

GARDNER, I. C. **MIRCEN**. J. v.2, p.147-160. 1986.

GAUTHIER, D.; DIEM, H. G.; DOMMARGUES, Y. In: MIDGELEY, S. J.; TURNBULL, J. W.; JOHNSTON, R. D. (Eds.). **Casuarina: Ecology, Management and Utilization**. CSIRO, Melbourne, p. 211-217, 1983.

GAVA, C. A. T. **Seleção de isolados de actinomicetos com uso potencial no controle biológico de fitopatógenos**. Tese de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 110 p. 1998.

GERDEMANN, J. W.; TRAPPE, J. W. The Endogonaceae in the Pacific Northwest. *Mycologia* **Memoir** n.5, p. 4. 1974.

GOTTLIEB, D. General consideration and implications of the actinomycetales. In: SYKES, G.; SKINNER, F. A. (Eds.). **Actinomycetales: Characteristics and practical importance**. London: Academic Press, p. 1-10, 1973.

GRUZMAN, I.; DÖBEREINER, J. Reunião Latino Americana sobre Inoculantes para Leguminosas. *Anais...* Porto Alegre: UFRGS, p. 84, 1968.

GRYNDLER, M. Interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with other soil organisms. In: KAPULNIK, Y.; DOUDS, JR D.D. (Eds.). **Arbuscular mycorrhizas: physiology and function**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 239–262, 2000.

HARRISON, M. J. Signaling in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 59, p. 19–42, 2005.

HAYMAN, D. S. Mycorrhizae of nitrogen-fixing legumes. **MIRCEN Journal**, v.2, p.121 – 145, 1986.

HILTNER, L. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründung und Brache. **Arb. Dtsch. Landwirtsch Ges.** Berl., v. 98, p. 59–78, 1904.

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. **Manual de métodos Empregados em estudo de Microbiologia Agrícola**. Brasília, EMBRAPA - SP I. 1994.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C.; GRAHAM, P. H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in South America. In: SINGH, R. P.;

SHANKAR, N.; JAIWAL, P.K. (Eds.). **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston: Studium Press, LLC, p.43-93, 2006.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.; C. CAMPO, R.; J. GRAHAM, P. H. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in: South America. In: WERNER, D.; NEWTON, W.E. (Ed.). **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment**. Dordrecht: Springer, p.25-42. 2005.

HUNT, H. W.; COLEMAN, D. C.; INGHAM, E. R.; INGHAM, R. E.; ELLIOT, E. T.; MOORE, J. C.; REID, C. P. P.; MORLEY, C. R. The detrital food web in a shortgrass prairie. **Biol. Fert. Soil**, v. 3, p. 57-68, 1987.

HUNTJENS, J. L. M. Amino acid composition of humic acid-like polymers produced by *Streptomyces* and of humic acids from pasture and arable land. **Soil. Biol. Biochem.** v.4, p.339-345. 1972.

JARGEAT, P.; COSSEAU, C.; OLA'H, B.; JAUNEAU A.; BONFANTE, P.; BATUT, J.; BECARD, G. Isolation, free-living capacities, and genome structure of '*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*', the endocellular bacterium of the mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. **Journal of Bacteriology**, v.186, n. 20, p. 6876–6884, 2004.

JEFFRIES, P.; GIANINAZZI, S.; PEROTTO, S.; TURNAU, K.; BAREA, J. M. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. **Biol. Fert. Soils** v. 37, p. 1–16, 2003.

KENNEDY, A. C. The rhizosphere and spermosphere. In: SYLVIA, D. M.; FUHRMANN, J. J.; HARTEL, P. G.; ZUBERER, D. A. (Eds.). **Principles and applications of soil microbiology**. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, p. 389–407, 1998.

KILLHAM, K. **Soil Ecology**. Cambridge University Press, New York. p. 242 1994.

KLOEPPER, J. W. Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). In: Y. OKON Y. (Eds.). **Azospirillum/plant associations**. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, p. 111–118, 1994.

KLOEPPER, J. W.; ZABLOTOWICK, R. M.; TIPPING, E. M.; LIFSHITZ, R. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: KEISTER, D. L.; CREGAN, P. B. (Eds.). **The rhizosphere and plant growth**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 315–326, 1991.  
KONONOVA, M. M. **Soil organic matter. Its nature, its role in soil formation and in soil fertility**. 2nd. English Ed. Pergamon Press. 1986.

KRISHNA, K. R.; BALAKRISHNA, A. N.; BAGYARAJ, D. J. Interactions between a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and *Streptomyces cinnamomeus* and their effects on finger millet. **New Phytol.** .v.92, p.401-405. 1982.

KRISHNA, K. R.; SHETTY, K. G.; DART, J.; ANDREWS, D. J. Genotype dependent variation in mycorrhizal colonization and response to inoculation of pearl millet. **Plant Soil**, v. 86, p. 113-25. 1985.

KUCEY, R. M. N; PAUL, E. A. Carbon flow photosynthesis, and N-2 fixation em mycorrhizal and nodulated faba beans (*Vicia faba* L.). **Soil Biology and Biochemistry**, v.14, p407 – 412, 1982.

KUSTER, E. Taxonomy of soil actinomycetes and related organisms. In: GRAY, T. R. G.; PARKINSON, D. (Eds.). **The ecology of soil bacteria**. Liverpool University Press, p.322-336,1986.

KUSTER, E. The actinomycetes. In: BURGESS, A.; RAW, F. (Eds.). **Soil Biology**, Academic Press, London. p.11-124. 1967.

KUTZNER, H. J. **Über die Bildung von Huminstoffen durch Streptomyceten**. Landwirtsch. Forsch., v.21, p.48-61. 1968.

LEE, PAU-JU & KOSKE, R. E. *Gigaspora gigantea*: parasitism of spores by fungi and actinomycetes. **Mycol. Res.** v.98, n.4, p.458-466, 1994.

LINDERMAN, R. G. Vesicular-Arbustcular Mycorrhizal and soil miccobial interactions. In: BETHLENFALVAY, G. J.; LINDERMAN, R. G. **Mycorrhizal in Sustainable Agriculture**. ASA, Wisconsin, n. 54. 1992.

LUGTENBERG, B. KAMILOVA, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. **Annu. Rev. Microbiol.** 63:541–56. 2009.

MARSCHNER, H. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2d Edition. Academic Press, London, 1995.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. San Diego: Academic, p. 889.1995.

MARSCHNER, H.; DELL, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. **Plant Soil**, v. 159, p. 89-102. 1994.

MELCHIORRE, M.; LUCA, M. J.; GUSTAVO GONZALEZ ANTA, G. G.; PAOLA SUAREZ, P.; LOPEZ, C.; RAMIRO LASCANO, R.; ROBERTO W. RACCA, R. W. Evaluation of bradyrhizobia strains isolated from field-grown soybean plants in Argentina as improved inoculants. **Biol Fertil Soils**, v. 47, n. 1, p. 81 – 89, 2011.

MEYER, J. R.; LINDERMAN, R. G. Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. **Soil Biol. Biochem.**, v.18, p.191-196, 1986b.

MEYER, J.R.; LINDERMAN, R.G. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*, **Soil Biol. Biochem.**, v.18, p.185-190, 1986a.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. Ed. Lavras: Editora UFLA. 2006.

MORTON, J. B.; BENNY, G. L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (zygomycetes): a new order glomales, two new suborders *Glominae* and *Gigasporinae* and two new of *Glomaceae*. **Mycotaxon**, v. 37, p. 471-491, 1990.

MOSSE, B. Growth and chemical compositions of mycorrhizal an non-mycorrhizal apples. **Nature**, v. 179, p. 922 – 924, 1957.

MOSSE, B. The role of mycorrhiza in legume nutrition on marginal soils. In Exploiting the Legume-Rhizobium Symbiosis. In. VINCENT, J M, WHITNEY, A S.; BOSE, J. (Eds.). **Tropical Agriculture** Univ. College of Trop. Agrie. Mise. Publ., University of Hawaii, Honolulu, v.145, p 275-292, 1977.

MOURA, A. B. Actinomicetos como agentes potenciais de controle biológico da murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) e como promotores de crescimento de tomateiro. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 64 p., 1996.

MUGNIER, J.; MOSSE, B. Spore germination and viability of a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae*. **Trans. Br. Mycol. Soc.** v.88, p.411-413, 1987.

NAMBIAR, P. T. C.; ANJIAH, V. Competition among strains of Bradyrhizobium and vesicular-arbuscular mycorrhizae for groundnut (*Arachis hypogaea* L.) root infection and their effect on plant growth and yield. **Biol. Fertil. Soils**, v. 8, n. 4, p. 311-318, 1989.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v. 54, n. 4, p. 655–670, 2003.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G.; VALORI, F. Effects of root exudates in microbial diversity and activity in rhizosphere soils. In: NAUTIYAL, C.S.; DION, P. (Eds.). **Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence**, Vol. 15, Soil Biology Series, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, pp. 339–368, 2008.

NEVES, M. C. P. RUMJANEK, N. G. Ecologia do Rizóbio em solos tropicais. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 27 p. (EMBRAPA:CNPAB, Documentos 23), 1996.

NEVES, M. C. P.; RAMOS, M. L. G.; MARTINAZZO, A. F.; BOTELHO, G. R.; DÖBEREINER, J. Adaptation of more efficient soybean and cowpea rhizobia to replace established populations. In: MULONGOY, K.; GUEYE, M.; SPENCER, D. S. C. (Eds.), **Biological Nitrogen Fixation and Sustainability of Tropical Agriculture**. Exeter, Wiley-Sayce, p. 219-233, 1992.

NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Diversity and adaptability of soybean and cowpea rhizobia in tropical soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.889-895, 1997.

NOGUEIRA, M. A. Interações entre micorriza arbuscular, rizobactérias, fósforo e silício na manifestação da toxidez de manganês em soja. Piracicaba, Universidade de São Paulo. 2002. 195 f. (Tese de Doutorado).

NORRIS, J. R.; READ, D.; VARNA, A. K. **Techniques for Mycorrhizal Research**. Academic Press, San Diego. 1994.

OSWALD, E. T.; FERCHAU, H. A. Bacterial associations of coniferous mycorrhizae. **Plant and Soil**, v. 28, p. 187-192, 1968.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity in the biosphere. **Science**, v. 276, p. 734–740, 1997.

PAUL, E. A.; CLARCK, F. E. **Soil Microbiology and Biochemistry**. Academic Press San Diego, 273 p. 1989.

PAULA, M. A.; REIS, V. M.; DOBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum sp.*) and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biol. Fertil. Soils**. v.11, p.111-115. 1991.

PAULA, M. A.; SIQUEIRA, J. O. Efeitos da umidade do solo sobre a simbiose endomicorrízica em soja: I. Colonização radicular, esporulação, nodulação e acúmulo de nitrogênio. **R. Bras. Ci. Solo**, Campinas, v.11, p.283 – 287, 1987.

PAULA, M. A.; SIQUEIRA, J. O.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares e de bactérias diazotróficas em batata-doce. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.17, p.349-356, set./dez. 1993.

PAULA, M. A.; SIQUEIRA, J. O.; HOSHIKA, E. Crescimento, nutrição e produção de soja inoculada com populações de fundos micorrízicos vesículo-arbusculares. **R. Bras. Ci. Solo**, Campinas, v.14, p.151 – 156, 1990.

PAULITZ, T. C.; MENGE, J. A. The effects of a mycoparasite on the mycorrhizal fungus, *Glomus deserticola*. **Phytopatology**. v.76, p.351-354.1986.

PAULITZ, T. C.; LINDERMAN, R. G. Interactions between fluorescent pseudomonads and VA mycorrhizal fungi. **New Phytol.**, v.113, p.37-45, 1989.

PEREIRA, J. C. **Ecologia da comunidade bacteriana em solos de cerrados**. Itaguaí,RJ: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. p.172. Tese de PhD. 1995.

PEREIRA, J. C.; NEVES, M. C. P.; DROZDOWICZ, A. Influência da antibiose exercida por actinomicetos às estirpes de *Bradyrhizobium* spp., na nodulação da soja. **Pesq. Agrop. Bras.**, Brasília, v. 34, n. 1, p. 99 – 108, 1999.

PEREIRA, J. C.; PAULA, M. A.; GUERRA, J. G. M.; MONTEIRO, E. M. S. Influência de actinomicetos no sistema simbiótico de *Glycine max* - *Bradyrhizobium japonicum* - *Glomus etunicatum* em solos sob cerrado. In: **IV REBRAM**, Resumos. Mendes. 1991.

PEREIRA, M. G. **Micorrizas Arbusculares em acerola (Malpighia emarginata D.C)**: Efeito da inoculação na fase de produção de mudas. 44 f. Dissertação (Especialização em Ciências Ambientais) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica RJ, 1995.

RAIMAM, M. P.; ALBINO, U.; CRUZ, M. F.; CRUZ, G. M.; LOVATO, F.; SPAGO, T. P.; FERRACIN, D. S.; LIMA, T.; GOULART, C. M.; BERNARDI, M.; MIYAUCHI, M. A.; NOGUEIRA, G. A. Interaction among free-living N-fixing bacteria isolated from *Drosera villosa* var. *villosa* and AM fungi (*Glomus clarum*) in rice (*Oryza sativa*). **Applied Soil Ecology**, v. 35, p. 25–34, 2007.

REDECKER D.; MORTON J. B.; BRUNS T. D. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). **Molecular Phylogenetics and Evolution** v.14, p.276–284, 2000.

REID, C. P. P. Mycorrhizas. In: LYNCH, J. M. (Ed.). **The Rhizosphere**. A Wiley-Interscience publication, p. 281-315, 1990.

ROSE, S. L. Mycorrhizal associations of some actinomycete nodulated nitrogen - fixing plants, **Can. J. Bot.**, v.58, p. 1449 - 54. 1980.

ROSS, J. P.; DANIELS, B. A. Hyperparasitism of endomycorrhizal fungi. In: SHENCK, N. C. (Ed.). **Methods and Principles of Mycorrhizal Research**, St Paul, MN: The American Phytopathological Society Press, p. 55-58, 1982.

ROSS, J. P.; RUTTENCUTTER, R. Population dynamics of two vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi and role of hyperparasitic fungi. **Phytopathology** v.67, p.490-496. 1977.

ROVIRA, A. D.; DAVEY, C. B. Biology of the rhizosphere. In: CARSON, E. W. (Ed.). **The plant root and its environment**. University Press of Virginia, Charlottesville, p. 153 -204. 1974.

SALA, V. M R.; FREITAS, S. S.; SILVEIRA, A. P. D. Interação entre fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas em trigo. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.42, n.11, p.1593-1600, 2007.

SALVIOLI, A.; CHIAPELLO, M.; FONTAINE, J.; HADJ-SAHRAOUI, A. L.; GRANDMOUGIN-FERJANI, A.; LANFRANCO, L.; BONFANTE, P. Endobacteria affect the metabolic profile of their host *Gigaspora margarita*, an arbuscular mycorrhizal fungus. **Environmental Microbiology**. 12(8), 2083–2095, 2010.

SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; COLAÇO, W. Fixação Simbiótica do N<sub>2</sub> em leguminosas tropicais. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba-RS: Agrolivros, p. 17-41, 2008.

SATHEEJA, S. V.; JEBAKUMAR, S. R. D. Phylogenetic analysis and antimicrobial activities of *Streptomyces* isolates from mangrove sediment. **Journal of Basic Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 71–79, 2011.

SCHÜßLER A.; SCHWARZOTT D.; WALKER C. A new fungal phylum, the Glomeromycota, phylogeny and evolution. **Mycological Research**, v.105, p.1413–1421, 2001.

SECÍLIA, J.; BAGYARAJ, D. J. Bacteria and actinomycetes associated with cultures of vesicular-arbuscular mycorrhizas. **Can J. Microbiol.** v.33, p.1069-1073. 1987.

SIEVERDING, E.; TORO, S. Influence of soil water regime on VA mycorrhizae. V. Performance of different VAM fungal species with cassava. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Berlin, v. 161, p. 322-332, 1988.

SILVA, E. M. R.; SOUZA, F. A.; FRANCO, A. A. The establishment of arbuscular mycorrhizal fungi associated with nodulated legume trees in land reclamation in the Amazon and Atlantic Forest regions of Brazil. In: International Conference Mycorrhizae, I. Berkeley, 1996. **Program and Abstracts**. Berkeley, University of California, 1996.

SIQUEIRA, J. O. ; KLAUBERG FILHO, O. Micorrizas Arbusculares: A Pesquisa Brasileira em Perspectiva. **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, v. 1, p. 235-264, 2000.

SIQUEIRA, J. O. **Biologia do Solo**. ESAL/FAEP, Lavras, Minas Gerais. p.230, 1993.

SIQUEIRA, J. O.; BREAKLEY, B. H.; HUBELL, D. H. Inibição da germinação de esporos de fungos micorrízicos vesicular-arbusculares por substâncias voláteis produzidas por actinomicetos isolados do solo. In: **I REBRAM**, Resumos. Lavras, MG. p.182-183. 1985.

SIQUEIRA, J. O.; HUBELL, D. H.; KIMBROUGH, J. W.; SHENCK, N. C. *Stachiobotrys chartarum* antagonistic to azygospores of *Gigaspora margarita* in vitro. **Soil Biol. Biochem.**, v.16, p.679-681, 1984.

SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; GRISI, B. M. HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. **Micro-organismos e processos biológicos do solo: Perspectiva ambiental**. Brasília: EMBRAPA. SP I. 1994.

SIQUEIRA, J. O.; PAULA, M. A. Efeito de micorrizas vesículo-arbusculares na nutrição e aproveitamento de fósforo pela soja em solo sob cerrado. **R. Bras. Ci. Solo**, Campinas, v.10, p.97 – 102, 1986.

SIQUEIRA, J. O.; SOAREA, C. R. F. S.; SANTOS, J. G. D.; SCHNEIDER, J.; CARNEIRO, M. A. C. Micorrizas e degradação do solo: caracterização, efeitos e ação recuperadora. **Tópicos Ci. Solo**, v.5, p.219 – 306, 2007.

SOUCHIE, E.; L. CAMPELLO, E.; F.; C. SAGGIN-JÚNIOR, O.; J. SILVA. E.; M.; R. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. **FLORESTA**, Curitiba, PR, v. 35, n. 2, mai./ago. 2005.

STRACK, D.; FESTER, T.; HAUSE, B.; SCHLIEMANN, W.; WALTER, M. H. Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical, and molecular aspects. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, n. 9, p. 1955 – 1979, 2003.

TEANEY, G. B.; FUHRMANN, J. J. Soybean response to nodulation by bradyrhizobia differing in rhizobitoxine phenotype. **Plant and Soil**, v.145, n. 2, p.275-285, 1992.

THIAGARAJAN, T. R.; AHMAD, M. H. Influence of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus on the competitiveness ability of Bradyrhizobia spp. for nodulation of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) in non-sterilized soil. **Biol. Fertil. Soils**, v.15, p.294-296, 1993.

TOMMERUP, I.C. Spore dormancy in vesicular-arbuscular fungi. **Trans. Br. Mycol. Soc.** v .81, p.37-45. 1983.

TUKEY, J. W. **Exploratory Data Analysis**, Reading, MA: Addison-Wesley. 1977.

TURPIN, P. E.; DHIR, V. K.; HAYCROFT, K. A.; ROWLANDS, C.; WELLINGTON, E. M. H. The effects of *Streptomyces* sp. on the survival of *Salmonellas* in soil. **Microbial Ecology**, Oxford, 1992.

TYLKA G. L.; HUSSEY, R. S. RONCADORI, R. W. Axenic germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: effects of selected *Streptomyces* species. **Phytopatology**. v.81, p.754-759. 1991.

VARGAS, M. A. T. HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. In: VARGAS, M. A. T. HUNGRIA, M. **Biologia dos Solos dos Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, p.524, 1997.

VARMA, A. Mycorrhizae, the Friendly Fungi: What we know, what should we know, and how do we know? In: VARMA, A. **Mycorrhiza Manual**. Springer, Berlin Heidelberg New York, p. 1-24,1998.

VEJSADOVA, H.; SBLIKOVA, D.; HRSELOVA, H.; VANCURA, V. Effect of the VAM fungus *Glomus* sp. on the growth and yield of soybean inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 140, n. 1, p. 121-125, 1992.

VEJSADOVA, H.; SIBLIKOVA, D.; GRYNDLER, M.; SIMON, T.; MIKSIK, I. Influence of inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Glomus claroideum* on seed yield of soybean under greenhouse and field conditions. **Journal of Plant Nutrition**, v.16, n.4, p.619 – 629, 1993.

VELDKAMP, H. A study of the aerobic decomposition of chitin by microorganisms. Mededelingen van de Landbou Whogeschool te Wageningen (Nederland) v.55, p.127-174. 1955.

WAKSMAN, S. A. **The role of antibiotics in nature: perspectives in biology and medicine.** Vol. II. USA, Univ. Chicago Press. 1961.

WEIJMAN, A. C. M.; MENZELAAR, H. L. C. Biochemical contribution to the taxonomic status of the Endogonaceae. **Can. J. Botany** v.57, p.284-291. 1978.

WELLINGTON, E. M. H.; TOTH, I. **Course of Actinomycetes Ecology.** CNPAB/EMBRAPA. 1992.

ZAIED, K. A.; EL-HADY, A. H.; AFIFY, A. H.; NASSEF, M. A. Yield and nitrogen assimilation of winter wheat inoculated with new recombinant inoculants of rhizobacteria. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.4, p.344-358, 2003.

ZILLI, J. E.; CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Eficácia da inoculação de *Bradyrhizobium* em pré-semeadura da soja. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.45, n.3, p.335-338, 2010.

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; MARSON, B. F.; GIANLUPPI, V.; CAMPO, R. J.; R. J.; HUNGRIA, M. Inoculação de *Bradyrhizobium* em soja por pulverização em cobertura. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.43, n.4, p.541-544, 2008.

ZILLI, J. E.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; FREIRE FILHO, F. R.; NEVES, M. C. P. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.41, n.5, p.811-818, 2006.

# APÊNDICES

APÊNDICE A - Tabela de Análise de Variância para a comparação dos tratamentos dos três fatores e suas interações para a variável BPAS do experimento I

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Estatística F	Significância (Valor-p)
Intercepto	559,12	1	559,12	1708,44	0,0000
Fator 1	142,50	2	71,25	217,71	0,0000
Fator 2	0,18	2	0,09	0,28	0,7544
Fator1 * Fator2	3,22	4	0,81	2,46	0,0488
Erro	39,60	121	0,33		
Total	781,02	130			

(\*) Teste (ANOVA) significativo ao nível de 5%;

APÊNDICE B - Tabela de Análise de Variância para a comparação dos tratamentos dos três fatores e suas interações para a variável BRS do experimento II

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Estatística F	Significância (Valor-p)
Intercepto	22,55	1	22,55	1169,66	0,0000
Fator1	3,43	2	1,72	89,06	0,0000
Error	2,45	127	0,02		
Total	29,49	130			

(\*) Teste (ANOVA) significativo ao nível de 5%;

APÊNDICE C - Tabela de Análise de Variância para a comparação dos tratamentos dos três fatores e suas interações para a variável BPAS/BRS do experimento II

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Estatística F	Significância (Valor-p)
Intercepto	3031,89	1	3031,89	1569,19	0,0000
Fator1	135,87	2	67,94	35,16	0,0000
Fator2	13,33	2	6,66	3,45	0,0349
Fator1 * Fator2	24,26	4	6,07	3,14	0,0170
Error	233,79	121	1,93		
Total	3531,88	130			

(\*) Teste (ANOVA) significativo ao nível de 5%;

APÊNDICE D - Tabela de Análise de Variância para a comparação dos tratamentos dos três fatores e suas interações para a variável BNS do experimento II

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Estatística F	Significância (Valor-p)
Intercepto	1,53	1	1,53	1517,71	0,0000
Fator1	0,57	2	0,28	281,78	0,0000
Fator2	0,02	2	0,01	10,32	0,0001
Fator3	0,01	2	0,01	5,13	0,0073
Fator1 * Fator3	0,01	4	0,00	3,04	0,0198
Error	0,12	119	0,00		
Total	2,38	130			

(\*) Teste (ANOVA) significativo ao nível de 5%;

APÊNDICE E - Tabela de Análise de Variância para a comparação dos tratamentos dos três fatores e suas interações para a variável P\_PAS do experimento II

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Estatística F	Significância (Valor-p)
Intercepto	73,06	1	73,06	2216,37	0,0000
Fator1	0,66	2	0,33	10,08	0,0001
Fator2	0,09	2	0,04	1,29	0,2788
Fator3	0,04	2	0,02	0,55	0,5771
Fator2 * Fator3	0,59	4	0,15	4,51	0,0020
Error	3,92	119	0,03		
Total	78,94	130			

(\*) Teste (ANOVA) significativo ao nível de 5%;

APÊNDICE F - Tabela de Análise de Variância para a comparação dos tratamentos dos três fatores e suas interações para as variáveis P\_RAIZ e P\_TOTAL do experimento II

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Estatística F	Significância (Valor-p)
Variável P_RAIZ					
Intercepto	91,69	1	91,69	4309,07	0,0000
Fator1	3,82	2	1,91	89,73	0,0000
Error	2,70	127	0,02		
Total	100,55	130			
Variável P_TOTAL					
Intercepto	328,66	1	328,66	5711,60	0,0000
Fator1	6,06	2	3,03	52,62	0,0000
Error	7,31	127	0,06		
Total	347,44	130			

(\*) Teste (ANOVA) significativo ao nível de 5%;

APÊNDICE G - Tabela de Análise de Variância para a comparação dos tratamentos dos três fatores e suas interações para a variável KPAS do experimento II

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Estatística F	Significância (Valor-p)
Intercepto	30908,84	1	30908,84	14110,97	0,0000
Fator1	700,74	2	350,37	159,96	0,0000
Fator2	10,16	2	5,08	2,32	0,1032
Fator3	42,49	2	21,25	9,70	0,0001
Fator1 * Fator2	52,00	4	13,00	5,93	0,0002
Fator1 * Fator3	72,50	4	18,12	8,27	0,0000
Fator2 * Fator3	49,25	4	12,31	5,62	0,0004
Error	243,14	111	2,19		
Total	31605,03	130			

(\*) Teste (ANOVA) significativo ao nível de 5%;

APÊNDICE H - Tabela de Análise de Variância para a comparação dos tratamentos dos três fatores e suas interações para a variável K\_RAIZ do experimento II

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Estatística F	Significância (Valor-p)
Intercepto	47314,77	1	47314,77	1313,61	0,0000
Fator1	7001,75	2	3500,88	97,20	0,0000
Fator2	239,47	2	119,74	3,32	0,0393
Fator1 * Fator2	622,21	4	155,55	4,32	0,0027
Error	4358,27	121	36,02		
Total	56910,86	130			

(\*) Teste (ANOVA) significativo ao nível de 5%;

APÊNDICE I - Tabela de Análise de Variância para a comparação dos tratamentos dos três fatores e suas interações para a variável K\_TOTAL do experimento II

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Estatística F	Significância (Valor-p)
Intercepto	154382,88	1	154382,88	4344,89	0,0000
Fator1	11971,47	2	5985,74	168,46	0,0000
Fator2	335,30	2	167,65	4,72	0,0107
Fator3	220,83	2	110,41	3,11	0,0485
Fator1 * Fator2	921,01	4	230,25	6,48	0,0001
Fator2 * Fator3	361,98	4	90,49	2,55	0,0431
Error	4086,18	115	35,53		
Total	167053,37	130			

(\*) Teste (ANOVA) significativo ao nível de 5%;

APÊNDICE J - Tabela de Análise de Variância para a comparação dos tratamentos dos três fatores e suas interações para a variável CA\_PAS do experimento II

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Estatística F	Significância (Valor-p)
Intercepto	9150,79	1	9150,79	5509,67	0,0000
Fator1	165,42	2	82,71	49,80	0,0000
Fator3	2,91	2	1,45	0,88	0,4192
Fator1 * Fator3	26,48	4	6,62	3,99	0,0045
Error	200,96	121	1,66		
Total	9452,37	130			

(\*) Teste (ANOVA) significativo ao nível de 5%;

APÊNDICE K - Tabela de comparações múltiplas das médias da variável CA\_PAS para os fatores 1 e 3 do experimento II

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Estatística F	Significância (Valor-p)
Variável CA_RAIZ					
Intercepto	3862,40	1	3862,40	1967,12	0,0000
Fator1	30,30	2	15,15	7,72	0,0007
Error	249,36	127	1,96		
Total	4191,29	130			
Variável CA_TOTAL					
Intercepto	24697,88	1	24697,88	5999,66	0,0000
Fator1	56,17	2	28,08	6,82	0,0015
Error	522,80	127	4,12		
Total	25232,22	130			

(\*) Teste (ANOVA) significativo ao nível de 5%;

APÊNDICE L - Tabela de Análise de Variância para a comparação dos tratamentos dos três fatores e suas interações para a variável MG\_PAS do experimento II

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Estatística F	Significância (Valor-p)
Intercepto	2836,30	1	2836,30	12858,23	0,0000
Fator1	57,68	2	28,84	130,76	0,0000
Fator3	0,79	2	0,40	1,80	0,1694
Fator1 * Fator3	3,46	4	0,87	3,92	0,0050
Error	26,69	121	0,22		
Total	2887,34	130			

(\*) Teste (ANOVA) significativo ao nível de 5%;

APÊNDICE M - Tabela de Análise de Variância para a comparação dos tratamentos dos três fatores e suas interações para a variável MG\_RAIZ do experimento II

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Estatística F	Significância (Valor-p)
Intercepto	12321,00	1	12321,00	2983,68	0,0000
Fator1	21,53	2	10,77	2,61	0,0779
Fator2	4,59	2	2,29	0,56	0,5754
Fator1 * Fator2	57,38	4	14,34	3,47	0,0101
Error	499,66	121	4,13		
Total	13008,75	130			

(\*) Teste (ANOVA) significativo ao nível de 5%;

APÊNDICE N - Tabela de Análise de Variância para a comparação dos tratamentos dos três fatores e suas interações para a variável MG\_TOTAL do experimento II

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Estatística F	Significância (Valor-p)
Intercepto	26942,52	1	26942,52	6198,85	0,0000
Fator1	13,07	2	6,54	1,50	0,2265
Fator2	3,31	2	1,66	0,38	0,6840
Fator1 * Fator2	62,03	4	15,51	3,57	0,0087
Error	525,91	121	4,35		
Total	27621,47	130			

(\*) Teste (ANOVA) significativo ao nível de 5%;

APÊNDICE O - Tabela de Análise de Variância para a comparação dos tratamentos dos três fatores e suas interações para a variável DARS do experimento II

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Estatística F	Significância (Valor-p)
Intercepto	55506,62	1	55506,62	182,38	0,0000
Fator1	9618,77	2	4809,39	15,80	0,0000
Fator2	1728,82	2	864,41	2,84	0,0627
Fator3	1168,39	2	584,20	1,92	0,1516
Fator1 * Fator2	2955,73	4	738,93	2,43	0,0521
Fator1 * Fator3	3240,56	4	810,14	2,66	0,0364
Error	33478,28	110	304,35		
Total	116483,22	125			