



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



MÁRCIA BACELAR FONSECA

**INTERAÇÕES BIÓTICAS E NITROGÊNIO AMONÍACAL NO
CRESCIMENTO INICIAL DE *Dimorphandra wilsonii* Rizz.**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto
de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de
Doutor em Biologia Vegetal.**

Área de Concentração: Fisiologia Vegetal

BELO HORIZONTE – MG

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



MÁRCIA BACELAR FONSECA

**INTERAÇÕES BIÓTICAS E NITROGÊNIO AMONÍACAL NO
CRESCIMENTO INICIAL DE *Dimorphandra wilsonii* Rizz.**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto
de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de
Doutor em Biologia Vegetal.**

Área de Concentração: Fisiologia Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Marcel Giovanni Costa França
Universidade Federal de Minas Gerais

Coorientadora: Prof. Dra. Cristina Cruz
Universidade de Lisboa

BELO HORIZONTE – MG

2013

F676i

Fonseca, Márcia Bacelar.

Interações bióticas e nitrogênio amoniacal no crescimento de *Dimorphandra wilsonii* Rizz / Márcia Bacelar Fonseca. – Belo Horizonte, 2013.
103 f. : il.

Tese (Doutorado em Biologia vegetal) – Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Marcel Giovanni Costa França. Coorientadora: Cristina Cruz.

1. Fisiologia vegetal. 2. Nutrição mineral. 3. Cerrado. 4. Amônio. 5. Simbiontes. 6. Competição. 7. Conservação. 8. *Dimorphandra wilsonii*. I. Título. II. França, Marcel Giovanni Costa. III. Cruz, Cristina. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Botânica.

CDU: 581

Para

Helga, Anaïs e Mia

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UFMG, em especial aos docentes, pelo aprendizado.

À CAPES, pela concessão da bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE).

À Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte, em especial ao Diretor do Jardim Botânico – Gladstone Correa de Araújo, pelo apoio.

À Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL), Centro de Biologia Ambiental (CBA), Lisboa-PT, em especial à Prof. Dra. Cristina Cruz, pela infraestrutura e apoio.

Aos meus orientadores Marcel Giovanni Costa França e Cristina Cruz, pela orientação, incentivo e amizade.

À Teresa Dias, pela orientação, incansável ajuda, incentivo e amizade.

À Prof. Manuela Carolino (FCUL/CBA), pelo aprendizado e amizade.

À Herculana Velez, pelo apoio e amizade.

Aos colegas da sala dos bolseiros (FCUL/CBA), pelo carinho e companheirismo.

À Cristina, Ana, Carneirinho e dona Teresa, pelo cuidado e carinho.

À Juliana, Marliane e Dinei, por dividirem comigo a experiência de ser estrangeiro em português.

Aos colegas do Jardim Botânico, pelo apoio, incentivo e carinho.

Aos amigos Cau, Laís, Pedro, Júnia Bacas, por viabilizarem a manutenção da minha ‘vida’ em Belo Horizonte e, indiretamente, em Lisboa.

Aos amigos Roberto, Cláudia, Júnia e Maurits, pela lufada de carinho.

Aos amigos Renato e Edson, pelo carinho e o conforto que é saber tê-los.

Aos amigos da Márcia Bacelar, da Márcia, da Marcinha, da Shy e da Baila, pelo carinho.

À Helga, pelo amor, pela amizade, pelo companheirismo... Por tudo.

Às minhas gatinhas Anaïs Nin e Maria de Medeiros (Mia), por fazerem a minha vida feliz.

RESUMO

O desmatamento do Cerrado brasileiro para implantação de áreas agrícolas fez com que a espécie arbórea *Dimorphandra wilsonii* Rizz. ficasse isolada e restrita em propriedades particulares ocupadas por pastagens de *Urochloa* spp. Assim, os estudos que compõem esta tese têm como objetivo avaliar a influência do N-NH₄⁺, de associações simbióticas com bactéria fixadora de N₂ (FBN) e fungo micorrízico arbuscular (FMA) e de *Urochloa decumbens* (Poaceae africana) no crescimento inicial de *D. wilsonii*. As hipóteses levantadas foram que o N- NH₄⁺ é a fonte preferencial de N-inorgânico desta espécie; que a presença dos simbiontes favorece o seu crescimento e facilita a coexistência entre *D. wilsonii* e *Urochloa decumbens*, mas a despeito disto a Poaceae africana compete com esta espécie arbórea do Cerrado. Para verificar tais hipóteses foram realizados dois experimentos em condições controladas, quando cultivou-se *D. wilsonii* em concentrações crescentes de N-NH₄⁺ (1,5 mM - concentração limitante, 3 mM - suficiente e 10 mM – alta), inoculada ou não com simbiontes (estirpe BHCB8.5/*Bradyrhizobium*. sp. - isolada a partir de nódulos de *D. wilsonii* - e uma espécie de FMA/*Glomus etunicatum*) e na presença ou ausência de *U. decumbens*, totalizando quatro (Cap. I) ou cinco tratamentos (nas doses de 3 e 10 mM usou-se um controle positivo da inibição da nitrificação – Nitrapyrin) (Cap. II).

A biomassa de *D. wilsonii* aumentou com o aumento da disponibilidade de N-amônio, estando positivamente correlacionada com a disponibilidade deste nutriente no substrato e negativamente com a de nitrato. As plantas que retiveram maior fração do N total adicionado foram as cultivadas com 1,5 e 3 mM de amônio, principalmente aquelas inoculadas com os simbiontes, o que ressalta a importância destas relações simbióticas na aquisição de N.

Embora a estirpe de *Bradyrhizobium*. sp. utilizada tenha sido isolada a partir de nódulos de *D. wilsonii*, não foi verificada a formação de nódulos. No entanto, a ocorrência de fixação

biológica de N₂, tendo como base o N contido na biomassa, foi sugerida nas plantas inoculadas e crescidas com 1,5 mM de amônio e, ainda, naquelas inoculadas e coexistindo com *U. decumbens* que receberam 3 mM de amônio. Assim, a fixação biológica de N₂ parece ser modulada pela pressão seletiva imposta pela baixa disponibilidade de N e pela competição por este nutriente. A colonização por *G. etunicatum* só foi identificada no tratamento que recebeu 3 mM de amônio e no qual *D. wilsonii* coexistiu com *U. decumbens*, aumentando significativamente o conteúdo de P na biomassa da espécie arbórea. A presença de *U. decumbens* afetou o crescimento de *D. wilsonii* pela competição direta por nutrientes e/ou indiretamente ao inibir o crescimento *in vitro* da bactéria.

Os dados sugerem que *D. wilsonii* tem o amônio como fonte preferencial de N inorgânico, que a relação simbiótica com *Bradyrhizobium* sp. e *G. etunicatum* pode beneficiá-la no aporte de N e P e minimizar os efeitos negativos impostos pela presença de *U. decumbens* e, por fim, que esta Poaceae africana pode inibir o crescimento e prejudicar a regeneração por plântula de *D. wilsonii* ao inibir o crescimento da bactéria fixadora de N₂ e/ou competir pelos nutrientes disponíveis. As informações obtidas neste trabalho poderão contribuir para a conservação do germoplasma de *D. wilsonii*, espécie criticamente ameaçada de extinção, tanto *in situ* quanto *ex situ*. No entanto, mais estudos são necessários para comprovar o que foi observado, sobretudo em condições de campo.

Palavras chave: Cerrado, *Dimorphandra wilsonii*, *Urochloa decumbens*, amônio, simbiontes, competição.

ABSTRACT

Deforestation of the Brazilian Cerrado for agriculture caused the tree species *Dimorphandra wilsonii* to become isolated and restricted to private properties occupied by pastures of *Urochloa* spp. Thus, the studies that comprise this thesis aim to evaluate the influence of N- NH_4^+ , symbiotic associations with N₂-fixing bacteria (NFB) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and *Urochloa decumbens* (African grass) in the initial growth of *D. wilsonii*. The hypotheses were that the N- NH_4^+ is the preferred source of inorganic N for this species, that the presence of symbionts favours the growth of *D. wilsonii* and facilitates its coexistence with *U. decumbens*, but despite this, the African grass competes with this Cerrado tree species. To verify these hypotheses two experiments were conducted under controlled conditions, by growing *D. wilsonii* seedlings under increasing concentrations of N- NH_4^+ (1.5 mM – limiting concentration; 3 mM – non limiting; and 10 mM – high) inoculated or not with symbionts (strain BHC8.5/*Bradyrhizobium* sp. – isolated from nodules *D. wilsonii*; and an AMF species/*Glomus etunicatum*) and in the presence or not of *U. decumbens*, summing up to four (Chapter I) or five treatments (under the 3 and 10 mM doses a positive control for nitrification inhibition was used – Nitrapyrin) (Chapter II).

D. wilsonii biomass accumulation increased with the increasing N-ammonium availabilities, and was positively correlated with the ammonium availability in the substrate and negatively with that of nitrate. The plants that retained a greater fraction of the total N added were those cultured with 1.5 and 3 mM N-ammonium, especially those inoculated with the symbiont, highlighting their role in increasing N acquisition.

Although *Bradyrhizobium* sp. strain that was used had been isolated from *D. wilsonii* nodules, there was no nodule formation. However, the N contained in plant biomass suggested the occurrence of N₂ fixation in the plants inoculated and grown with 1.5 mM of N-ammonium and also those inoculated and coexisting with *U. decumbens* receiving 3 mM of N-

ammonium. Thus, biological N₂ fixation appears to be modulated by selective pressures imposed by low N availability and competition for this nutrient. Colonization by *G. etunicatum* was only observed in the treatment with 3 mM of N-ammonium that *D. wilsonii* coexisted with *U. decumbens*, significantly increasing the P content in the biomass of the tree species. The presence of *U. decumbens* affected the growth of *D. wilsonii* by direct competition for nutrients and / or indirectly by *in vitro* inhibiting the growth of the bacteria. Data suggest that *D. wilsonii* prefers N-ammonium as a source of inorganic N, the symbiotic relationship with *Bradyrhizobium* sp. and *G. etunicatum* can benefit the tree species by contributing to N and P acquisition and minimizing the negative effects imposed by the presence of *U. decumbens* and that this African grass can inhibit *D. wilsonii*'s growth and impair its regeneration through seedlings by inhibiting the growth of N₂-fixing bacteria and / or compete for nutrients. The information obtained in this study may contribute to the *in situ* and *ex situ* conservation of the *D. wilsonii*'s germoplasm, a critically endangered species. However, more studies are needed to confirm what was observed, especially under field conditions.

Keywords: Cerrado, *Dimorphandra wilsonii*, *Urochloa decumbens*, ammonium, symbionts, competition.

ÍNDICE

Introdução Geral	1
Referências	9
Capítulo I:	Crescimento inicial da árvore brasileira <i>Dimorphandra wilsonii</i> também é ameaçado pela graminea africana <i>Urochla decumbens</i>	
Abstract	19
Introdução	20
Material e Métodos	22
Resultados	28
Discussão	30
Referências	35
Capítulo II:	Presença de simbioses atenua competição entre uma gramínea africana e <i>Dimorphandra wilsonii</i> , uma árvore do cerrado criticamente ameaçada de extinção	
Abstract	49
Introdução	50
Material e Métodos	53
Resultados	58
Discussão	60
Referências	66
Discussão Geral	79
Referências	91

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

Alterações globais

Nenhuma espécie, ainda que com uma população significativamente grande, alteraria seu ecossistema se consumisse somente os recursos necessários para a sua manutenção, mas a espécie humana difere profundamente de todas as outras na forma como os transforma (Ellis 2011). Neste sentido, o crescimento da população humana e da demanda por recursos que a subsista vem sendo mantido pela conversão dos ecossistemas em áreas agrícolas, industriais e urbanas. Tais conversões transformam e intensificam o uso da terra acarretando perda da biodiversidade, alteração nos ciclos biogeoquímicos e impulsiona as mudanças climáticas (Vitousek *et al.* 1997).

O desmatamento dos ecossistemas terrestres é em si a causa mais severa da perda da biodiversidade (Sala *et al.* 2000), enquanto que as alterações no ciclo do nitrogênio (N) (Vitousek & Melillo 1979) e a introdução de espécies exóticas (D'Antonio & Vitousek 1992) são também determinantes no processo de regeneração da vegetação. Em relação às alterações no ciclo do N, Vitousek e colaboradores (1982) demonstraram que em ecossistemas onde a ciclagem do N é relativamente baixa (relação C:N na serrapilheira alta e N orgânico resistente à decomposição) antes do desmatamento, a regeneração da vegetação é mais lenta. Por outro lado, em ecossistemas com maior circulação do N (menor relação C:N na serrapilheira e N orgânico mais facilmente mineralizado) o desmatamento resulta inicialmente no aumento da disponibilidade de amônio, mas à medida que a nitrificação se intensifica o nitrato passa a ser a forma predominante do N. Nesta situação, a regeneração da vegetação é favorecida, mas uma vez que a perda de nitrato por lixiviação pode ser elevada ela pode vir a ser limitada. No que se refere à

introdução de espécies exóticas após o desmatamento de florestas ou savanas neotropicais, o uso de espécies de Poaceae africanas está associado à formação de pastagens destinada à pecuária intensiva, uma vez que estas espécies são mais tolerantes ao pastoreio e à seca sazonal do que as Poaceae nativas (Williams & Baruch 2000). A introdução das espécies deste grupo, em escala regional, altera o clima, devido ao aumento da temperatura e diminuição da umidade e precipitação, e intensifica a frequência dos ciclos de fogo (Schukla *et al.* 1990). Localmente, o sucesso competitivo das Poaceae introduzidas em produzir biomassa e conseqüentemente reduzir a luminosidade na superfície do solo, a disponibilidade de água e a de nutrientes tem como maior consequência o atraso ou a alteração do processo de regeneração da vegetação (D'Antonio & Vitousek 1992).

Ainda que as consequências das alterações no uso da terra sejam descritas enquanto processos individuais elas estão fortemente interligadas. Entretanto, considera-se que a perda da biodiversidade, as interferências no ciclo do N e as mudanças climáticas já ultrapassaram os limites de segurança, fora dos quais o planeta pode perder sua estabilidade (Rockström *et al.* 2009).

Cerrado

O Cerrado ocupa uma área de 2 milhões de quilômetros quadrados na porção central do Brasil, cobrindo parte dos estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rondônia, Paraná, Piauí, São Paulo e Tocantins (Embrapa Cerrados 2012). Em grande parte da região de ocorrência deste bioma o clima é estacional, com o período de chuva ocorrendo entre os meses de outubro a março e o seco de abril a setembro (Silva *et al.* 2008). A vegetação deste bioma se desenvolve

sobre solos antigos, intemperizados, ácidos, com baixa fertilidade e elevadas concentrações de alumínio que combinado ao clima estacional e à frequência dos ciclos de fogo determinam suas fitofisionomias campestres, savânicas e florestais (Reatto *et al.* 2008; Ribeiro & Walter 2008). Dentre as formações florestais, o cerradão se desenvolve em solos profundos, com média a baixa fertilidade e teor de matéria orgânica médio, mas anualmente incrementado pelos resíduos orgânicos proveniente da deposição das folhas durante a estação seca (Ribeiro & Walter 2008). A diversidade florística verificada nestas fitofisionomias é alta e o padrão de ocorrência das espécies é em mosaicos formados por grupos de espécies dominantes, de ampla distribuição, e aquelas de ocorrência restrita /endêmica (Felfili *et al.* 2008).

A cobertura vegetal original do Cerrado foi, e ainda vem sendo, removida para a implantação de pastagens, culturas agrícolas anuais e, mais recentemente, de florestas destinadas à produção de carvão e celulose, resultando em contínua perda da biodiversidade, fragmentação de habitats, invasão de espécies exóticas e formação de áreas degradadas. (Klink & Machado 2005). Em virtude da sua elevada biodiversidade e da forma e intensidade com que vem sendo explorado, este bioma foi reconhecido internacionalmente como um dos 25 *hot spots* para a conservação (Myers *et al.* 2000).

Dimorphandra wilsonii

Dimorphandra wilsonii Rizz., também conhecida como Faveiro de Wilson, é uma espécie arbórea de 12-15 m de altura, com copa frondosa, folhas bipinadas grandes e semidecíduas, flores amareladas dispostas em inflorescência compacta corimbosa-paniculada e frutos do tipo legume indeiscente (Fig. 1) (Silva 1986). Esta espécie da família Fabaceae (TIPO - RB 138.949 / 1968), sub-família Caesalpinioideae, tem

ocorrência descrita para a transição entre a mata semidecídua e o cerrado do município de Paraopeba, Minas Gerais, Brasil (Fig. 2) (Rizzini 1969). Dezoito anos após a sua determinação botânica, Rizzini e Matos Filho (1986) identificaram somente 18 árvores de *D. wilsonii* em sua área de ocorrência e a declararam em perigo de ser extinta. Vinte e um anos após esta publicação Fernandes e colaboradores (2007) verificaram que daqueles 18 indivíduos só restavam 10 árvores adultas dispersas em áreas de pastagens formadas por espécies de *Urochloa*. Diante da destruição do seu hábitat, da sua ocorrência restrita e sua população estar isolada de remanescentes de Cerrado, *D. wilsonii* foi incluída na Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da IUCN (2006) e do Brasil (IBAMA 2008) como uma espécie criticamente ameaçada de extinção.

O grau de ameaça em que *D. wilsonii* se encontra é consequência da conversão de 77% da área de Cerrado que cobria o estado de Minas Gerais em pastagens (Fig. 3) (Sano *et al.* 2008). Para a implantação destas pastagens foi priorizado o uso de espécies de Poaceae africanas como *Andropogon gayanus* Kunth., *Urochloa decumbens* Stapf, *U. brizantha* (Hochst. ex. A. Rich) Stapf, *U. humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga, *Hyparrhenia rufa* (Nees) Stapf e *Melinis minutiflora* Beauv. (Klink & Machado 2005). Ao serem introduzidas estas espécies encontraram condições edafoclimáticas muito próximas àquelas das savanas africanas que acrescido às características biológicas comuns às Poaceae, como alta eficiência fotossintética e no uso dos nutrientes; altas taxas de crescimento, rebrota e regeneração; tolerância à seca, herbivoria e desfolhamento; ciclo reprodutivo curto, sexuado e assexuado, lhes conferiram vantagem competitiva frente às espécies nativas remanescentes (Williams & Baruch 2000). O elevado potencial invasivo destas espécies também pode ter sido favorecido pela produção de substâncias alelopáticas (D'Antonio & Vitousek 1992). Está bem descrito na literatura a ação destas substâncias na germinação e crescimento de plantas (Souza *et*

al. 2006) e também tem sido proposto que algumas espécies da família Poaceae têm habilidade para suprimir a nitrificação, um mecanismo de adaptação para a conservação e eficiência no uso do N em ambientes com baixa oferta deste nutriente (Lata *et al.*, 2004). Dentre as espécies de *Poaceae* africanas investigadas, *Urochloa humidicola* e *U. decumbens* apresentaram os maiores conteúdos de inibidor da nitrificação em exsudados de raízes intactas (Subbarao *et al.* 2012). Com todas estas vantagens competitivas as *Poaceae* africanas podem causar perdas locais da biodiversidade e também podem interferir no ecossistema alterando, dentre outros processos ecológicos, a dinâmica sucessional, principalmente no que se refere ao recrutamento de espécies arbóreas (Pivello *et al.* 2011).

Os programas de conservação de espécies ameaçadas de extinção visam assegurar o potencial evolucionário e a persistência destas espécies em seus habitats. Para tanto, o conhecimento da biologia da espécie e o entendimento, controle e/ou eliminação dos fatores que levaram ao declínio das populações originais são fundamentais (Primack & Rodrigues 2001). Neste sentido, os estudos que compõem esta tese têm como objetivo geral investigar de que forma a disponibilidade em N amoniacal influencia o crescimento inicial e as estratégias de uso do N por *D. wilsonii*, nomeadamente através do estabelecimento de relações simbióticas (com bactérias fixadoras de N₂ e com FMA) e à coexistência com outra espécie potencialmente competidora. Os resultados obtidos com este trabalho poderão contribuir para o manejo dos indivíduos remanescentes desta espécie *in situ*, para o estabelecimento de parâmetros que auxiliem na sua reintrodução e, conseqüentemente, na manutenção do seu germoplasma.

Contextualização dos estudos

Este trabalho representa a continuidade aos estudos que foram tema da dissertação de mestrado realizada por mim no ano de 2007, cujo objetivo foi investigar o crescimento inicial de *D. wilsonii* em solo de Cerrado. Os resultados obtidos demonstraram que *D. wilsonii* é uma espécie que apresenta requerimento nutricional coerente com seu habitat de origem no Cerrado, mas que pode ter a fixação biológica de N₂ como estratégia adaptativa para seu crescimento em solo com baixa disponibilidade de nutrientes (Fonseca *et al.* 2010a). Observou-se ainda que a relação simbiótica entre *D. wilsonii* e bactérias fixadoras de N₂ (FBN), incomum na subfamília Caesalpinioideae, é efetiva e com significativa fixação de N₂; que os nódulos são indeterminados, os bacteroides ficam retidos em “correntes de infecção persistentes” e, ainda, que cinco estirpes extraídas destes nódulos podem ser de cinco espécies ainda não descritas de *Bradyrhizobium* (Fonseca *et al.* 2012). Posteriormente, iniciaram-se investigações em plantas cultivadas no Jardim Botânico da Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte buscando avaliar se *D. wilsonii* também estabeleceria associação simbiótica com fungos micorrízicos. Os resultados permitiram identificar a ocorrência concomitante de ectomicorrizas (ECM) e micorriza arbuscular (FMA) que lhe garantiriam maior aporte de N e fósforo (P) (Fonseca *et al.* 2010b). A tripla simbiose verificada pode ser essencial na dinâmica dos nutrientes necessários para sustentar o crescimento desta espécie em solos oligotróficos, revelando-se uma importante estratégia adaptativa. Estes resultados demonstraram a adaptabilidade de *D. wilsonii* à oligotrofia comum aos solos do cerrado.

Dando sequência a estes estudos e tomando por base a disponibilidade do N inorgânico no ambiente florestal e na pastagem e o efeito desta para as plantas e microrganismos do solo, foi iniciada a investigação que compõem esta tese.

Estrutura da tese

Este trabalho é composto por dois capítulos redigidos no formato de artigo científico que têm como objetivo avaliar a influência de concentrações crescentes de nitrogênio amoniacal e da presença e ausência de microrganismos simbiotes (FBN e FMA) e de uma Poaceae africana no crescimento inicial de *D. wilsonii*. O primeiro capítulo tem como hipótese que a relação simbiótica bactéria-planta-fungo pode beneficiar o crescimento de *D. wilsonii* em condições limitantes de N. O segundo capítulo enfatiza a maior disponibilidade de N e tem como hipótese que *D. wilsonii* tem o amônio como fonte preferencial de N-inorgânico, que a relação simbiótica bactéria-planta-fungo pode beneficiar seu crescimento e coexistência com a Poaceae africana, mas que a despeito disto há competição por nutrientes entre as espécies vegetais.

REFERÊNCIAS

D'ANTONIO CM; VITOUSEK PM (1992) Biological invasions by exotic grasses, the grass/fire cycle, and global change. *Annual Review of Ecology and Systematics* 23:63-87.

ELLIS, EC (2011) Anthropogenic transformation of the terrestrial biosphere. *Philosophical Transactions of the Royal Society A* 369:1010-1035.

EMBRAPA CERRADOS. Informações sobre o bioma cerrado. Disponível em: [HTTP://www.semrah.goias.gov.br](http://www.semrah.goias.gov.br).

FELFILI, JM; FELFILI, MC; NOGUEIRA, PE; ARMAS, JFS; FARINAS, MR; NUNES, M; JÚNIOR, MC da S; REZENDE, AV; FAGG, CW (2008) Padrões fitogeográficos e sua relação com sistemas de terra no bioma cerrado. In: SANO, SM;

ALMEIDA, SP de; RIBEIRO, JF (Ed) Cerrado: ecologia e flora. Embrapa Cerrados – Brasília, DF: Embrapa informações tecnológicas. p. 215-228.

FERNANDES, FM; FONSECA, AG; KAECHLE, K; GOULART, MF; MARINHO, W; SOUZA, HAV; QUEIROZ, AR; GIORNI, V; OLIVEIRA, G; RODRIGUES, MJ; BACELAR, M; LOVATO, MB (2007) Tentando evitar mais uma extinção: o caso do Faveiro de Wilson (*Dimorphandra wilsonii* Rizz.). In: Recuperando o verde para as cidades - A Experiência dos Jardins Botânicos Brasileiros. Investing in Nature - Rio de Janeiro/Brasil. p. 87-98.

FONSECA MB; FRANÇA MGC; ZONTA E; GIORNI V (2010a) Crescimento inicial de *Dimorphandra wilsonii* (Fabaceae - Caesalpinioideae) em diferentes condições de fertilidade em solo de cerrado. Acta Botanica Brasilica 24(2):322-327.

FONSECA MB; SIMÕES JL; ISAÍAS RMS; FRANÇA MG; SCOTTI MR; JAMES EK; SPRENT J (2010b) Rhizobial and arbuscular mycorrhizal fungal symbioses in *Dimorphandra wilsonii*, a threatened caesalpinioideae legume native to Brazilian Cerrado. In: Book Contributions of XIII National Meeting of the Spanish Society of Nitrogen Fixation and II Portuguese-Spanish Congress on Nitrogen Fixation. Zaragoza (Spain). p. 127-128.

FONSECA, MB (2007) Influência da fertilidade do solo e caracterização da fixação biológica de N₂ para o crescimento de *Dimorphandra wilsonii* Rizz. (Fabaceae – Caesalpinioideae). Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais.

FONSECA, MB; PEIX, A; MATEOS, PF; RIVERA, LP; SIMÕES-ARAÚJO, JL; FRANÇA, MGC; ISAIAS, RM dos S; CRUZ, C; VELÁZQUEZ, E; SCOTTI, MR; SPRENT, JI; JAMES, EK (2012) Nodulation in *Dimorphandra wilsonii* Rizz.

(Caesalpinioideae), a threatened species native to the Brazilian Cerrado. PLoS One 7(11): e49520.

IBAMA (2008) Lista das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. Disponível em: [HTTP://www.ibama.gov.br](http://www.ibama.gov.br).

IUCN (2006) IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>.

KLINK, CA; MACHADO, RB (2005) A conservação do Cerrado brasileiro. Megadiversidade 1(1):147-155.

LATA, JC; DEGRANGE, V; RAYNAUD, X; MARON, PA; LENSI, R; ABBADIE, L (2004) Grass populations control nitrification in savanna soils. Functional Ecology 18:605-611.

MYERS, NRA; MITTERMEIER, CG; FONSECA, GAB; KENT, J (2000) Biodiversity hot spots for conservation priorities. Nature 403: 853–858.

PIVELLO, VR (2011) Invasões biológicas no Cerrado brasileiro: efeitos da introdução de espécies exóticas sobre a biodiversidade. Ecologia.info 33. Disponível em: <http://www.ecologia.info/cerrado.htm>.

PRIMACK, RB; RODRIGUES, E (2001) Biologia da Conservação. Londrina: E. Rodrigues, 2001. p. 327.

REATTO, A; CORREIA, JR; SPERA, ST; MARTINS, ÉDER de S (2008) Solos do bioma cerrado: aspectos pedológicos. In: SANO, SM; ALMEIDA, SP de; RIBEIRO, JF (Ed) Cerrado: ecologia e flora. Embrapa Cerrados – Brasília, DF: Embrapa informações tecnológicas. p. 109-149.

RIBEIRO, JF; WALTER, BMT (2008) As principais fisionomias do bioma cerrado. In: SANO, SM; ALMEIDA, SP de; RIBEIRO, JF (Ed) Cerrado: ecologia e flora. Embrapa Cerrados – Brasília, DF: Embrapa informações tecnológicas. p. 153-212.

RIZZINI, CT (1969) Espécies novas de árvores do planalto central brasileiro. Anais da Academia Brasileira de Ciências 41(2):239-244.

RIZZINI, CT; MATOS FILHO, A de (1986) Espécies vegetais em extinção. Boletim da Sociedade Brasileira para a Conservação da Natureza 21(4):99-104.

ROCKSTRÖM J; STEFFEN W; NOONEL K; PERSSON A; CHAPIM III FS; LAMBIN EF; LENTON TM; SCHEFFER M; FOLKE C; SCHELLNHUBER HJ; NYKVIST B; WIT CA de; HUGHES T; VAN DER LEEUW S; RODHE H; SÖRLIN S; SNYDER PK; COSTANZA R; SVEDIN U; FALKENMARK M; KALBERG L; CORELL W; FABRY VJ; HANSEN J; WALKER B; LIVERMAN D; RICHARDSON K; CRUTZEN P; FOLEY JA (2009) A safe operating space for humanity. Nature 461:472-475

SALA, OE; CHAPIM III, FS; ARMESTO, JJ; BERLOW, E; BLOOMFIELD, J; DIRZO, R; HUBER-SANWALD, E; HUENNEKE, L; JACKSON, RB; KINZIG, A; LEEMANS, R; LODGE, DM; MOONEY, HA; OESTERHELD, M; POFF, NL; SYKES, MT; WALKER, BH; WALKER, M; WALL, D (2000) Global biodiversity scenarios for the year 2100. Science 287:1770-1774.

SANO, EE; ROSA, R; BRITO, JLS; FERREIRA, LG (2008) Mapeamento semidetalhado do uso da terra do bioma cerrado. Pesquisa Agropecuária Brasileira 43(1)153-156.

SCHUKLA, J; NOBRE, C; SELLERS, P (1990) Amazonian deforestation and climate change. *Science* 247:1322-1324.

SILVA, FAM da; ASSAD, ED; EVANGELISTA, BA (2008) Caracterização climática do bioma cerrado. In: SANO, SM; ALMEIDA, SP de; RIBEIRO, JF (Ed) Cerrado: ecologia e flora. Embrapa Cerrados – Brasília, DF: Embrapa informações tecnológicas. p. 69-87.

SILVA, MF (1986) Monograph 44: *Dimorphandra* (Caesalpinaceae). In: Flora Neotropica. The New York Botanical Garden.

SOUZA LS; VELINE ED; MARTINS D; ROSOLEM CA (2006) Efeito alelopático do capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) sobre o crescimento inicial de sete espécies de plantas cultivadas. *Planta Daninha* 24(4):657-668.

SUBBARAO, GV; SAHRAWAT, KL; NAKAHARA, K; ISHIKAWA, T; KISHII, M; RAO, IM; HASH, CT; GEORGE, TS; RAO PS; NARDI, P; BONNETT, D; BERRY, W; SUENAGA, K; LATA, JC (2012) Biological nitrification inhibition – A novel strategy to regulate nitrification in agricultural systems. *Advances in Agronomy* 114: 249-306.

VITOUSEK, PM; GOSZ, JR; GRIER, CC; MELILLO, JM; REINERS, WA (1982) A comparative analysis of potential nitrification and nitrate mobility in forest ecosystems. *Ecological Monographs* 52(2):155-177.

VITOUSEK, PM; MELILLO, JM (1979) Nitrate losses from disturbed forests: patterns and mechanisms. *Forest Science* 25:605-619.

VITOUSEK, PM; MOONEY, HA; LUBCHENCO, J; MELILLO, JM (1997) Human domination of earth's ecosystems. *Science* 277:494-499.

WILLIAMS DG; BARUCH Z (2000) African Grass invasion in the Americas:
ecosystem consequences and role of ecophysiology. *Biological Invasions* 2:123-140.

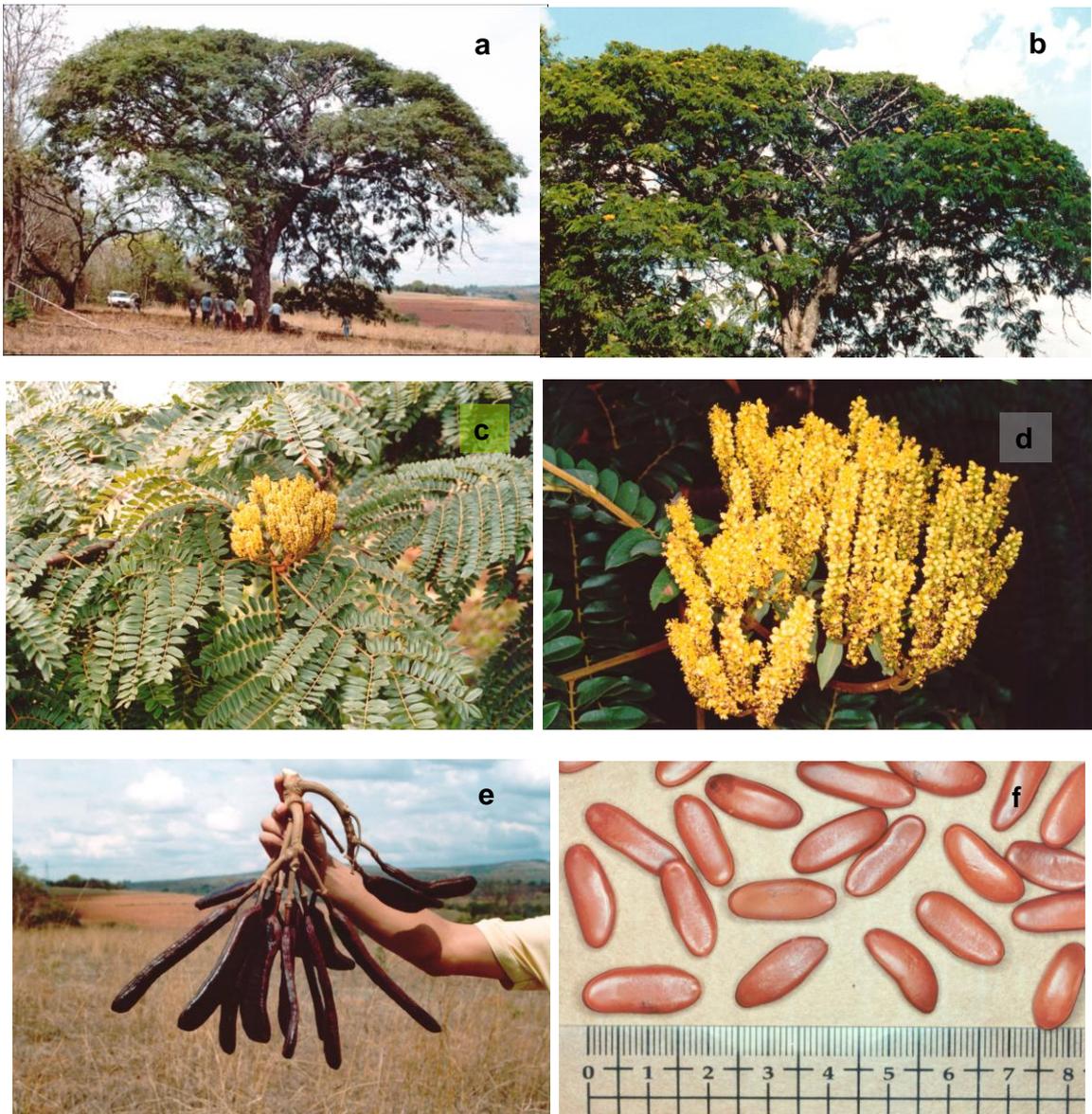


Figura 1. a) *Árvore de Dimorphandra wilsonii* Rizz., b) Detalhe do dossel de um indivíduo, c) Folhas e inflorescência, d) Inflorescência, e) Frutos maduros, f) Sementes. Fotos: Fernando Fernandes.

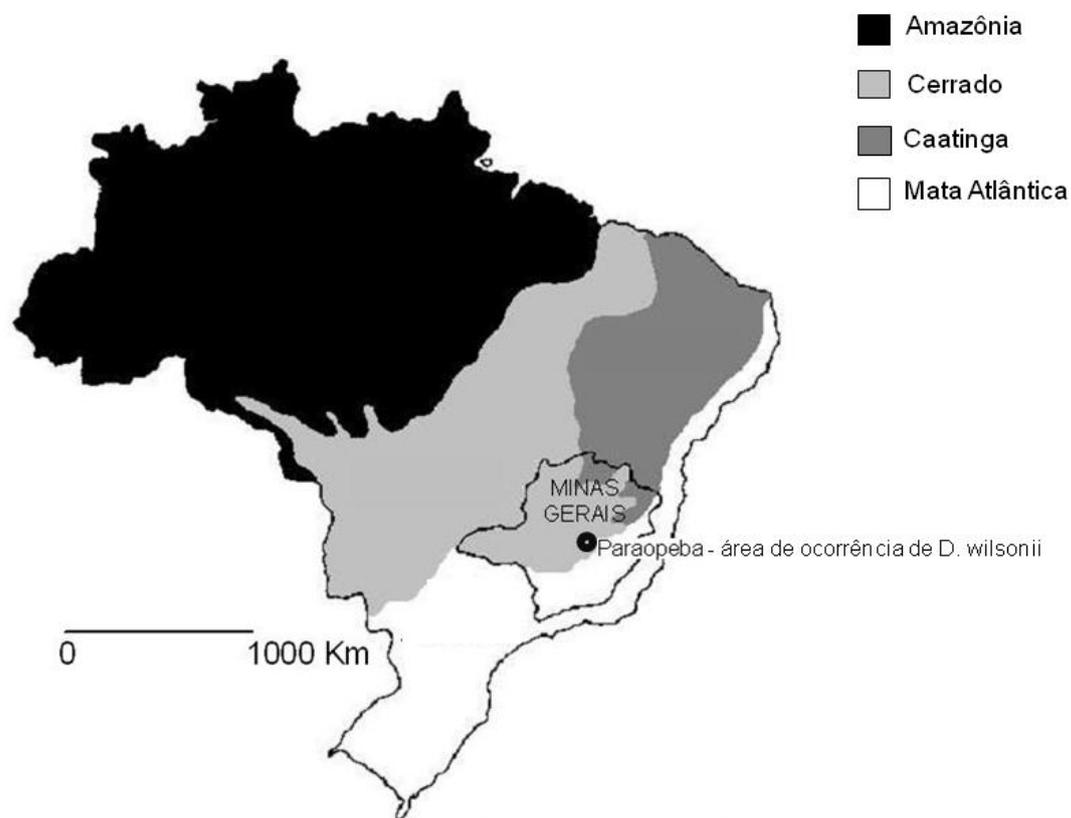


Figura 2. Caracterização da área de ocorrência natural de *Dimorphandra wilsonii* Rizz. (transição Cerrado/Mata semidecídua) em relação à distribuição dos biomas brasileiros. O círculo preto representa o Município de Paraopeba – MG, região de distribuição restrita desta espécie (Fernandes *et al.* 2007).

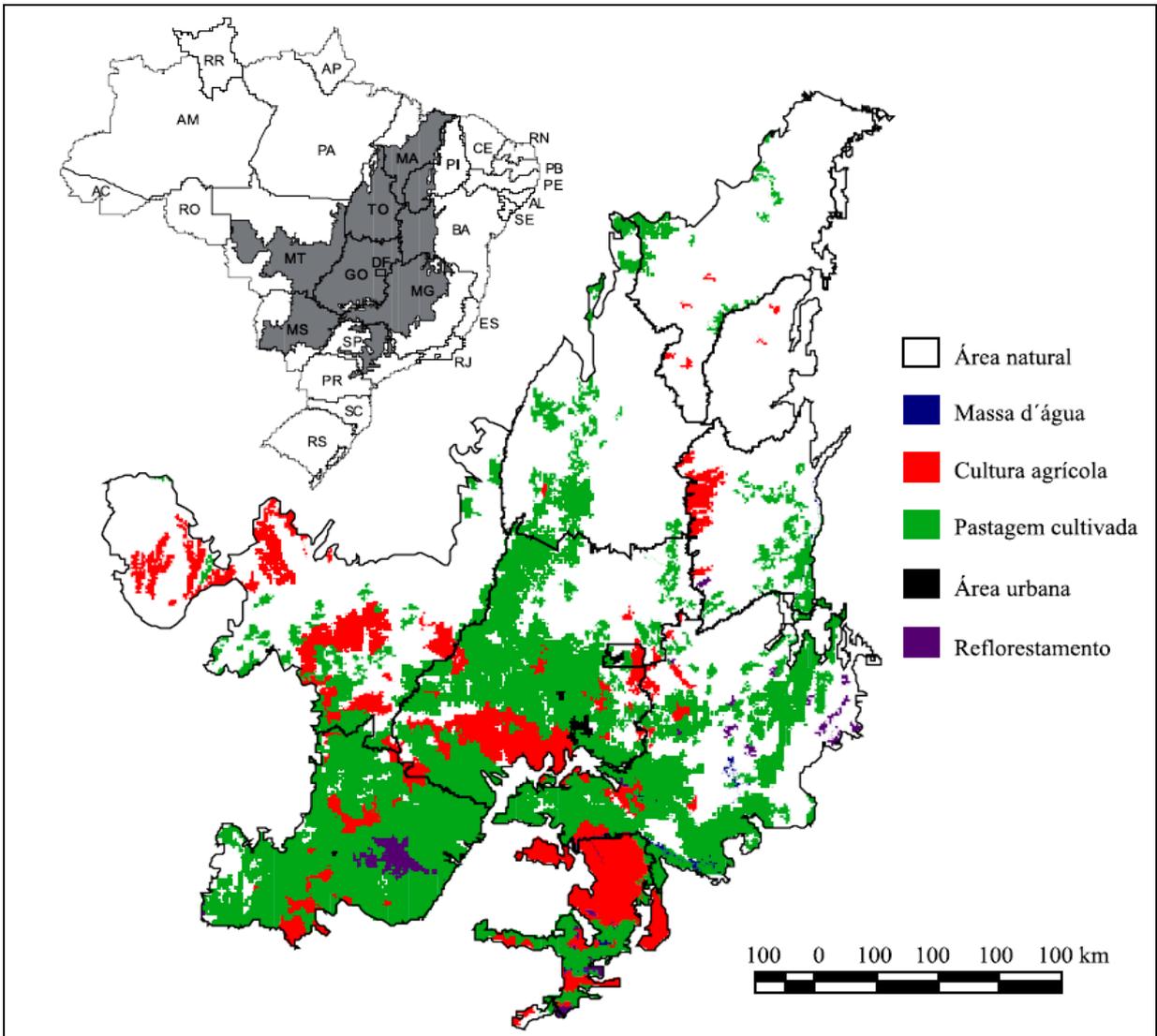


Figura 3. Distribuição espacial das classes de uso da terra no Cerrado no ano de 2002. (Sano *et al.* 2008).

CAPÍTULO I – CRESCIMENTO INICIAL DA ÁRVORE BRASILEIRA
Dimorphandra wilsonii TAMBÉM É AMEAÇADO PELA GRAMÍNEA
AFRICANA *Urochloa decumbens**

* FONSECA, MB; CAROLINO, MMSSL; DIAS, T; CRUZ, C; FRANÇA, MGC (2013) Early growth of Brazilian tree *Dimorphandra wilsonii* is also threatened by African grass *Urochloa decumbens*. Journal of Plant Interactions (in press - [doi/abs/10.1080/17429145.2013.770085](https://doi.org/10.1080/17429145.2013.770085)).

CRESCIMENTO INICIAL DA ÁRVORE BRASILEIRA *Dimorphandra wilsonii* TAMBÉM É AMEAÇADO PELA GRAMINEA AFRICANA *Urochloa decumbens*

Márcia B. Fonseca^{ab} • Maria M. S. S. de L. Carolino^b • Teresa Dias^b • Cristina Cruz^b • Marcel G. C. França^{a*}

^a Departamento de Botânica, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brasil; ^b Faculdade de Ciências, Centro de Biologia Ambiental, Universidade de Lisboa, Portugal; * Autor para correspondência

ABSTRACT

The conversion of the Brazilian savannas for pastures and agricultural use has caused the species *Dimorphandra wilsonii* (Fabaceae - Caesalpinioideae) has become restricted to areas occupied by African grasses of *Urochloa* sp. This highly endangered tree species was cultivated in the presence of *Bradyrhizobium japonicum* (symbiont 1), *Glomus etunicatum* (symbiont 2), and *Urochloa decumbens* in low nitrogen (N) availability. Even though the nodulation and mycorrhization was of low occurrence, the inoculated plants with symbionts had the greatest nitrogen and chlorophyll content, photosynthetic radiation-use efficiency and biomass accumulation in relation to the plants which had not been inoculated and/or cultivated in the presence of *U. decumbens*. The results suggest effective N₂ fixation, independent of the localization of bacteria, whether in the root tissue interior or free in the rhizosphere. Therefore, the presence of N₂-fixing bacteria can benefit the early growth of *D. wilsonii*, whereas the occurrence and aggressive persistence of *U. decumbens* can limit this development, increasing the threat of extinction of this species in their habitat.

Keywords: Cerrado; conservation; photosynthesis; biological fixation

INTRODUÇÃO

Uma das alterações globais mais importantes é a perda da biodiversidade, sendo as mudanças no uso da terra, como a conversão dos ecossistemas tropicais em áreas de pastagens, uma das suas principais causas (Rockström *et al.* 2009).

Nas últimas décadas a vegetação do Cerrado foi removida em favor da agricultura e da pecuária e, conseqüentemente, muitas espécies endêmicas nestas áreas estão criticamente ameaçadas de extinção, como é o caso de *Dimorphandra wilsonii* Rizz. (Faveiro de Wilson). Esta espécie arbórea, com potencial aplicação medicinal – seus frutos contêm rutina, quercetina e ramnose – foi descrita por Rizzini (1969) como ocorrente no limite entre o cerradão e a mata semidecídua (Paraopeba - Minas Gerais/Brasil) e dezessete anos depois já havia sido declarada em perigo de extinção (Rizzini & Matos Filho 1986). Atualmente, a população de *D. wilsonii* está isolada e restrita a áreas de pastagens de *Urochloa* sp. em propriedades particulares na mesma região (Fernandes *et al.* 2007).

O Cerrado se estabelece em solos de baixa fertilidade natural e se mantém em função do equilíbrio entre a vegetação e os ciclos biogeoquímicos. Assim, a introdução de espécies exóticas de Poaceae, usadas para pastagens, altera o ecossistema em nível biótico e abiótico (D'Antonio & Vitousek 1992). Desta substituição resulta a competição por nutrientes, água e luz entre as espécies introduzidas e as nativas/endêmicas remanescentes (Williams & Baruch 2000). No que se refere à disponibilidade de nutrientes no solo após a remoção da vegetação natural e estabelecimento da pastagem, o nitrogênio (N) é o que apresenta as maiores perdas (Vitousek *et al.* 1982) e em acordo com estas informações, Fonseca *et al.* (2010a) verificaram que *D. wilsonii* (Fabaceae) apresenta requerimento nutricional coerente com a fertilidade do solo de sua área de

origem, mas pode ter a fixação biológica de N₂ (FBN), incomum à subfamília Caesalpinioideae, como uma estratégia adaptativa para se estabelecer em solos oligotróficos. Fonseca *et al.* (2010b) verificaram, ainda, raízes de *D. wilsonii* colonizadas por micorriza arbuscular (FMA) e ectomicorrizas (ECM) e estas colonizações também podem estar relacionadas com estratégias adaptativas da espécie para sobreviver em solos com baixa oferta de nutrientes, não só relacionado à absorção e transferência de fósforo como também do N (Cruz *et al.* 2007). A tripla simbiose verificada em *D. wilsonii* pode ser essencial na dinâmica dos nutrientes para esta espécie e precisa ser investigada detalhadamente, uma vez que as ECM são frequentes na subfamília Caesalpinioideae, mas os FMA e a FBN são menos comuns dentro deste grupo (Lavin *et al.* 2005).

Segundo Heywood & Iriondo (2003), o conhecimento das relações estabelecidas entre a espécie e seu ambiente torna mais efetiva as ações para sua conservação e diante do grau de ameaça em que *D. wilsonii* se encontra torna-se relevante o estudo dos fatores bióticos e abióticos que caracterizam o seu habitat atual. Com o objetivo de estudar as relações entre estes fatores, cultivou-se *D. wilsonii* na presença da estirpe BHCB8.5/*Bradyrhizobium* sp. (FBN), *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann (FMA) e *Urochloa decumbens* Stapf (pastagem). Nossa hipótese é que a relação simbiótica planta-bactéria-fungo possa beneficiar a planta em condições limitantes de N e, ainda, possibilitar que a espécie arbórea em crescimento inicial possa se estabelecer e coexistir com a expansão da gramínea africana no Cerrado.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal: *Dimorphandra wilsonii* Rizz. - sementes coletadas dos indivíduos remanescentes foram escarificadas mecanicamente para quebra da dormência, desinfestadas em etanol 70% (v/v) por um minuto, posteriormente em hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) por dez minutos e lavadas abundantemente em água destilada esterilizada. Três sementes foram semeadas em vasos de 2,5 L preenchidos com uma mistura de areia e vermiculita esterilizadas na proporção de 1:1 (v/v). Após a germinação, uma plântula em boas condições, com aproximadamente 10 cm de altura, foi mantida em cada vaso. O total de 20 plantas foi dividido em quatro grupos de cinco plantas que receberam ou não os inóculos e/ou plântulas de *U. decumbens* (Tab. 1). A adubação, subdividida em duas aplicações de 50 ml por semana, foi feita com solução de Hoagland modificada, $\frac{1}{4}$ de força iônica, e a concentração do N-NH_4^+ foi de 1,5 mM. Após 120 dias de cultivo as plantas de *D. wilsonii* foram coletadas, separadas em raiz e parte aérea, e secas à temperatura de 60 °C até a obtenção da massa constante. A biomassa seca foi utilizada para a determinação da biomassa da raiz, parte aérea e total.

***Urochloa decumbens* Stapf** - as sementes foram escarificadas em ácido sulfúrico (96%, 18 M) por 15 min para quebra da dormência, lavadas abundantemente em água destilada esterilizada e semeadas em potes de 2,5 L contendo uma mistura de areia e vermiculita esterilizadas na proporção de 1:1 (v/v). Após 10 dias de cultivo quatro destas plântulas foram transplantadas para os vasos contendo *D. wilsonii* de acordo com os tratamentos (Tab. 1). Ao longo do experimento a parte aérea das plantas de *U. decumbens* foi cortada a 5 cm de altura do substrato, para evitar a competição pela luz entre as duas espécies. A biomassa resultante destes cortes (após secagem a 60 °C , até a obtenção da massa constante) foi somada à biomassa das plantas inteiras coletadas ao final do experimento

Identificação molecular da bactéria fixadora de N₂, avaliação da viabilidade dos esporos do inóculo micorrízico e dupla inoculação

A estirpe BHCB8.5 (*Bradyrhizobium* sp.) foi previamente isolada de nódulos extraídos das raízes de *D. wilsonii* cultivadas em vasos e purificada em meio YMA (Vincent 1970). A partir de culturas puras desta estirpe, o gene 16S rDNA da bactéria foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando o primer PA/907R. O produto desta reação foi, então, purificado com kit comercial Easy Spin. Ambos os processos foram realizados por ICAT/FCUL (Portugal). O fragmento molecular de interesse foi sequenciado por Macrogen, Inc. (Korea) e a sequência obtida comparada com sequências depositadas no GeneBank (Program BLASTN 2.2.25+). A estirpe BHCB8.5 foi crescida em meio de cultura YMB (Vincent 1970) a 28 °C, sob agitação constante, por 48 h. Posteriormente as células microbianas foram lavadas, centrifugadas e ressuspensas em solução salina (NaCl 0,9%) esterilizada. Os tratamentos adotados (Tab. 1) receberam 1 mL (10^8 ufc mL⁻¹) da suspensão bacteriana inoculados na zona radicular. No final do experimento as raízes de *D. wilsonii* dos tratamentos inoculados foram avaliadas quanto à ocorrência de nódulos. A partir da identificação prévia dos FMA colonizadores das raízes de *D. wilsonii* (Fonseca *et al.* 2010b) a espécie de FMA selecionada para este estudo foi *Glomus etunicatum*. A avaliação da viabilidade dos esporos do inóculo, obtidos da Simbyom (República Checa), foi feita como proposto por Walley & Germida (1995). A partir de três amostras de 100 g do inóculo, os esporos foram isolados por peneiramento úmido seguido por centrifugação (Daniels & Skipper 1982). Posteriormente três amostras de 40 esporos foram colocadas em solução de INT (iodonitrotetrazólio – 1 mg mL⁻¹) à temperatura ambiente por 48 h e visualizadas em microscópio estereoscópico. O INT, em contato com os esporos, é reduzido por desidrogenases do tecido vivo que adquire a cor

avermelhada. Variações nesta coloração são proporcionais à atividade enzimática no esporo e permite o estabelecimento do grau de viabilidade deste. Assim, os esporos corados do vermelho ao laranja foram considerados viáveis e aqueles marrons ou pretos inviáveis. Para a inoculação fúngica utilizaram-se como inoculante 200 esporos por vaso da espécie *G. etunicatum*, obtidos da Simbyom (República Checa), aplicados na zona radicular dos tratamentos adotados (Tab. 1). Após o cultivo, segmentos radiculares de *D. wilsonii* com 1 cm de comprimento, obtidos 1 a 2 cm acima do ápice radicular, foram corados (Koske & Gemma 1989) e a colonização avaliada em placa quadriculada como proposto por Giovannetti & Mosse (1980).

Avaliação da dupla inoculação e da presença de *U. decumbens* no crescimento de *D. wilsonii*

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2×2 [presença ou ausência de inoculação (estirpe BHCB8.5 e *G. etunicatum*) \times presença ou ausência de *U. decumbens*], totalizando 4 tratamentos com cinco repetições (Tab. 1).

O experimento foi conduzido no outono - inverno, em estufa com iluminação natural e temperatura ambiente média de 16 °C. A temperatura do ambiente radicular foi mantida entre 20-25 °C usando-se vermiculita úmida aquecida por uma manta térmica sob os vasos. A umidade na vermiculita foi controlada diariamente usando-se um medidor de umidade do solo (WSM – 101) e mantida pela a adição de água destilada esterilizada quando necessário. A temperatura no ambiente radicular foi igualmente controlada através do termostato da manta aquecedora com o auxílio de termômetros dispostos em diferentes pontos da vermiculita úmida.

Indicadores fisiológicos e análises químicas

Os índices de refletância fotoquímica (PRI) e do conteúdo de clorofila (CHL) foram usados como indicadores fisiológicos de mudanças na dinâmica da fotossíntese por meio de medida da refletância da luz em folhas intactas e permitiram estimar a eficiência no uso da radiação fotossintética e o conteúdo de clorofila. As medições da refletância foliar foram feitas com UniSpec-SC (Single Channel) Spectral Analysis System (Delta T [device]), em três dias consecutivos e de insolação plena no período entre 10 e 14 h. Foram avaliados três folíolos totalmente expandidos de cada uma das cinco plantas de cada tratamento usando-se um “Standart Leaf Clip” conectado por fibra ótica à fonte de luz de halogênio e ao detector. O índice de refletância fotoquímica foi estimado usando-se a equação: $PRI = (R531 - R570) / (R531 + R570)$, onde R531 e R570 são as refletâncias em 531 e 570 nm, respectivamente (Peñuelas *et al.* 1995). O conteúdo de clorofila foi estimado pela equação: $CHL = R750 / R700$, onde R750 e R700 são as refletâncias em 750 e 700 nm respectivamente. O "R" de cada comprimento de onda corresponde à razão entre a refletância da amostra (folha) e da referência branca (Richardson *et al.* 2002).

A estimativa do conteúdo de N e da relação C/N nas plantas de *D. wilsonii* foi feita a partir de raízes inteiras que foram secas a 60 °C até a massa constante, moídas a pó em moinho de bolas (MM 2000) e pesadas em cápsulas de estanho que em seguida foram dobradas e fechadas. A determinação da percentagem de N e carbono (C) foi feita pelo método de análise elementar (EuroVector) por combustão – DCT (Rodrigues *et al.* 2010). O conteúdo total de N por planta foi estimado a partir da %N da raiz e da biomassa total.

Avaliação *in vitro* do efeito alelopático da *Urochloa decumbens* sobre o inóculo bacteriano

Extratos aquosos de *U. decumbens* foram obtidos a partir de folhas e raízes previamente secas a 60 °C em estufa de circulação de ar forçada até a obtenção de massa constante. Folhas e raízes foram individualmente trituradas em água, usando-se homogeneizador triturador refrigerado (Omni-Mixer Sorval), na proporção de 2:50 e 0,5:50 (g:mL), respectivamente. Posteriormente, cada uma das suspensões foram centrifugadas a 3500 rpm e o sobrenadante considerado extrato 100%. A avaliação do efeito alelopático sobre a estirpe BHCB8.5 foi feita em quatro réplicas para cada um dos dois extratos testados e o parâmetro utilizado para a avaliação foi a observação e medição de halos de inibição de crescimento em meio sólido (Ferronato *et al.* 2007). A partir de uma cultura pura da estirpe BHCB8.5, em fase exponencial de crescimento, inoculou-se por espalhamento a superfície das placas de Petri com meio YMA, divididas previamente em setores (1 réplica por sector). Foram aplicadas alíquotas de 150 µl de cada extracto aquoso em poços (definidos com a extremidade de uma pipeta Pasteur) e discos de papel de filtro dispostos nos respectivos setores da placa de Petri. Para o controle foram aplicados 150 µl de água destilada. Todas as placas de Petri foram mantidas em estufa de crescimento a 28 °C por cinco dias.

Avaliação *in vitro* do efeito de promoção do crescimento pela estirpe BHCB8.5

Foram testados três meios de cultura sem fornecimento de N: YMA (Vincent 1970), Ashby's Manitol M706 (Subb-Rao 1977) e LGI (Magalhães *et al.* 1983). A estirpe BHCB8.5 foi crescida em meio YMA e transferida para placas de Petri com os diferentes meios de cultura, com quatro repetições por meio de cultura, de acordo com o método de diluição sucessiva proposto por Oliveira & Magalhães (1999). As placas

foram mantidas em estufa de crescimento a 28 °C e as avaliações feitas a cada cinco dias, durante 15 dias. De acordo com o crescimento nas zonas da placa foram atribuídas pontuações para o crescimento que podiam variar entre 1 (sem crescimento visível) a 4 (crescimento em todas as zonas). Com base no crescimento em cada zona da placa a estirpe foi classificada como tendo baixo, moderado ou efetivo crescimento em meio de cultura sem fonte de N (Tab. 3). A produção de ácido indol acético (AIA) pela estirpe BHCB8.5 foi avaliada pelo método colorimétrico proposto por Gordon & Weber (1950). A cultura foi crescida até a fase exponencial em meio YMB e após a centrifugação do meio de cultura, a 6000 g por 15 min a 4 °C, foram retirados 2 mL do sobrenadante e transferidos para tubos de ensaio nos quais foram adicionados 2 mL de reagente [1 mL de FeCl₃ – (0,5 mM) em HClO₄ 35%]. Os tubos foram agitados, incubados por 25 min e a absorbância lida a 530 nm usando-se espectrofotômetro Camspec M105.

Análise estatística

As estatísticas descritivas relativas ao crescimento de *D. wilsonii* foram comparadas para os diferentes tratamentos pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). A existência de correlações lineares entre os diversos parâmetros de crescimento estudados foi examinada usando a correlação de Pearson. Para todos os casos, efetuaram-se análises preliminares que comprovaram a distribuição normal dos dados. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa SPSS, versão 19.0.

RESULTADOS

A estirpe BHCB 8.5 foi identificada como *Bradyrhizobium japonicum* bv. *glycinearum* (USDA 110) e o inóculo composto por esta estirpe foi apto em produzir nódulos. O resultado do teste de viabilidade do inóculo fúngico composto por *G. etunicatum* demonstrou que 72% dos esporos estavam viáveis. Assim, ambos os inóculos demonstraram estar aptos a induzirem o estabelecimento das simbioses nos tratamentos inoculados (Simb e Simb + Ud). Após 120 dias de cultivo, nas plantas de *D. wilsonii* dos tratamentos que foram inoculados (Simb e Simb + Ud) verificou-se que uma planta do tratamento Simb apresentava um único nódulo, em estágio inicial de desenvolvimento, e uma massa de células indiferenciada junto à região de emergência de uma das raízes laterais. Neste tratamento não foi detectada colonização micorrízica nas raízes. No tratamento Simb + Ud não foi verificada a formação de nódulos, mas as raízes apresentaram 1% de taxa de micorrização. As plantas do tratamento Simb apresentaram maior biomassa de raiz (Fig. 1), maior eficiência no uso da radiação fotossintética (Fig. 2a), maior conteúdo de clorofila (Fig. 2b) e maior conteúdo de N (Fig. 3a). Quando estes parâmetros foram considerados entre si, algumas correlações tornaram-se evidentes (Tab. 2). A biomassa de raiz foi positivamente correlacionada à biomassa da parte aérea ($r=0,83$), biomassa total ($r=0,95$) e com o conteúdo de clorofila/CHL ($r=0,69$). Também a eficiência no uso da radiação fotossintética (PRI) apresentou correlação positiva com a biomassa da parte aérea ($r=0,61$) e total ($r=0,60$), com o conteúdo de clorofila/CHL ($r=0,65$) e com o conteúdo de N ($r=0,64$). O conteúdo de clorofila (CHL) também se correlacionou positivamente com a biomassa da raiz ($r=0,69$) e total ($r=0,64$).

O conteúdo de N só se correlacionou positivamente com PRI ($r=0,64$). Também ficou evidente pela ANOVA que a presença de *U. decumbens* e dos inóculos (Simb + Ud)

resultou em menor: (i) biomassa radicular, aérea e total (Fig. 1); (ii) eficiência no uso da radiação fotossintética (PRI) e (iii) conteúdo relativo de clorofila (Fig. 2a e b); (iv) menor conteúdo de N e maior relação C/N (Fig. 3a e b). O resultado obtido para a relação C/N revelou que não houve diferença significativa entre os tratamentos em que *D. wilsonii* e *U. decumbens* estiveram juntas (Simb+Ud e Ud) e o Controle, sugerindo que não houve competição por nutrientes entre estas espécies (Fig. 3 b).

As plantas do tratamento Simb + Ud não apresentaram nódulos e isto permitiu levantar a hipótese que a presença da *U. decumbens* poderia ter comprometido a simbiose. Assim, foi feita a avaliação *in vitro* do efeito alelopático desta Poaceae sobre a estirpe BHCB8.5 e o resultado demonstrou que os extratos, sobretudo o de raízes, provocaram a inibição do crescimento da bactéria no meio de cultura (Fig. 5). Uma vez que fungos micorrízicos arbusculares são simbioses obrigatórios e que não houve colonização das raízes do tratamento Simb, o efeito positivo observado neste tratamento pode estar relacionado ao inóculo bacteriano. Assim, realizaram-se testes para a avaliação do potencial de promoção do crescimento pela estirpe. Para verificar se a bactéria seria capaz de fixar N₂ em vida livre realizou-se o teste de avaliação do crescimento *in vitro* da estirpe BHCB8.5 sem fonte de N e o resultado demonstrou baixo crescimento nos meios Ashby's Manitol M706 e LGI e que no meio YMA sem extrato de levedura a estirpe superou a pontuação referente ao crescimento médio, mesmo tendo apresentado crescimento inicialmente baixo (Fig. 4). O maior crescimento radicular observado nas plantas do tratamento Simb poderia estar relacionado ao balanço hormonal da planta e por isto foi feito o teste de produção de AIA pela estirpe *in vitro*, entretanto o resultado encontrado foi negativo.

DISCUSSÃO

A similaridade genética entre a estirpe BHCB 8.5 e *B. japonicum* bv. *glycinearum* (USDA 110) é convergente com o histórico de ocupação do Cerrado para a produção de soja [*Glycine max* L. (Merrill)] em larga escala, quando esta bactéria foi introduzida, adaptou-se, distribuiu-se e naturalizou-se em solo brasileiro (Ferreira & Hungria 2002). No presente estudo, ainda que no tratamento Simb a nodulação tenha sido incipiente e que não tenha havido micorrização, o inóculo de *B. japonicum* (estirpe BHCB8.5) foi efetivo, uma vez que estas plantas apresentaram maiores biomassa de raiz, eficiência fotossintética, conteúdo de clorofila e conteúdo de N (Figs. 1, 2a, 2b e 3a). A não ocorrência da nodulação no tratamento Simb + Ud pode ter sido influenciada também pela presença de *U. decumbens*, como sugerem os resultados do teste de avaliação *in vitro* do efeito alelopático desta espécie sobre a estirpe BHCB8.5 (Fig. 5). O efeito alelopático de *Urochloa* sp. em plantas é bem descrito na literatura (Souza *et al.* 2006), mas pouco se sabe sobre o efeito alelopáticos destas sobre os microrganismos do solo, embora seja conhecido o efeito da *U. humidicola* como inibidor da nitrificação (Subbarao *et al.* 2006).

No que se refere ao inóculo micorrízico, ainda que os fungos FMA colonizadores das raízes de *D. wilsonii* não tenham sido identificados em nível de espécie (Fonseca *et al.* 2010b), a escolha do *G. etunicatum* como inóculo se deu por sua abundância em solos agrícolas (Douds *et al.* 1995) e, ao mesmo tempo, por ser um dos fungos de maior amplitude, em termos de colonização e efeito positivo desta, em espécies arbóreas tropicais (Pouyu-Rojas *et al.* 2006). Em nosso estudo, a micorrização foi detectada exclusivamente nas raízes de *D. wilsonii* do tratamento Simb + Ud, mas esta também foi incipiente (1% de taxa de micorrização), embora o inóculo tenha apresentado 72% de viabilidade.

Uma vez que os inóculos utilizados eram viáveis e que houve efeito dos simbiossiontes no tratamento Simb, porque a nodulação e micorrização foram tão incipientes? O processo de infecção das raízes da planta hospedeira tanto por rizóbio quanto por FMA é controlado pela planta, que, por sua vez, é afetada pelas condições ambientais (Bécard *et al.* 1992; Hartwig 1998). Em baixas concentrações de N, fósforo (P) e outros nutrientes as plantas exsudam compostos fenólicos que controlam diretamente os processos que melhoram a absorção e a assimilação de nutrientes na rizosfera, principalmente, por agirem como sinais químicos para microrganismos e promoverem o crescimento de microrganismos livres no solo (Cesco *et al.* 2012). Em relação à infecção pelo rizóbio, a insuficiente exsudação destes compostos, sobretudo flavonoides, interfere na indução do gene *nod* e, conseqüentemente, na produção e liberação dos Fatores Nod, que são fundamentais para o processo de infecção e formação do nódulo (Hartwig 1998). Os flavonoides também são determinantes no início do processo de colonização das raízes por AMF, por induzirem a germinação dos esporos e/ou crescimento da hifa (Dakora & Philips 2002).

A biossíntese de flavonoides inicia-se com a conversão da fenilalanina em ácido cinâmico, reação catalisada pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), e fatores endógenos (genótipo, estágio de desenvolvimento da planta, etc.) e exógenos (fatores ambientais) podem afetar sua atividade (Cesco *et al.* 2012). A luz e a temperatura são fatores ambientais que interferem tanto na fotossíntese quanto na atividade da PAL e, conseqüentemente, na biossíntese de flavonoides. Alguns estudos demonstram que baixas temperaturas podem aumentar a produção de flavonoides, mas que a acumulação destes é dependente da luz (Jaakola & Hohtola 2010). Ainda que a temperatura na zona radicular das plantas tenha sido mantida na faixa de 20-25 °C, favorável tanto ao rizóbio quanto ao AMF (Wang *et al.* 2002; Zang *et al.* 2003), a qualidade da luz e temperatura

ambiente na estufa podem ter limitado a atividade fotossintética e, conseqüentemente, afetado a produção de flavonoides resultando em nodulação e taxa de micorrização incipientes.

Diante do exposto, como explicar o efeito de promoção do crescimento em *D. wilsonii* verificado no tratamento Simb (Figs. 1, 2a, 2b e 3a)? Os estudos que abordam a capacidade de promoção do crescimento por espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, para além da fixação do N₂ no interior do nódulo, referem-se a este benefício vinculado a espécies de não Fabaceae, principalmente em sistemas de rotação de culturas quando uma Fabaceae antecede uma não Fabaceae (Hayat *et al.* 2010). Estes dois gêneros de rizobactérias produzem moléculas como fitormônios, solubilizadores de fosfatos, inibidores de microrganismos patogênicos, fatores Nod e vitaminas que auxiliam no crescimento das plantas.

No presente estudo foi verificado que as plantas do tratamento Simb acumularam mais biomassa, principalmente nas raízes (Fig. 1). O crescimento radicular está diretamente ligado ao balanço hormonal entre auxina e citocinina e a produção e/ou o balanço destes fitormônios pode ser estimulado por rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR). Antoun e colaboradores (1998) testaram a ação de inóculos de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* em *Raphanus sativus* L. (Brassicaceae), e observaram que 33% dos 18 inóculos de *B. japonicum*, incluindo o genótipo similar ao da estirpe BHCB8.5 (USDA 110), produziam AIA, mas que somente 5% destes inóculos solubilizavam fosfato bicálcico. O resultado do teste *in vitro* de produção de AIA pela estirpe BHCB8.5 foi negativo, mas este resultado pode não ser conclusivo uma vez que a concentração da fonte de triptofano do meio de cultura usado pode não ter sido suficiente para que a síntese de AIA atingisse níveis determináveis (Spaepen & Vanderleyden 2010).

As plantas de *D. wilsonii* do tratamento Simb apresentaram maior eficiência no uso radiação fotossintética (PRI) que se correlacionou positivamente com a biomassa da parte aérea, biomassa total e conteúdo de clorofila. Bactérias da família Rhizobiaceae produzem sinais moleculares, Fatores Nod, que além de desempenharem papel fundamental no estabelecimento da simbiose bactéria-planta podem atuar ainda em outros processos fisiológicos da planta como promotores do crescimento (Dakora 2003). Em soja, a aspersão de 10^{-7} M de Fatores Nod isolados de *B. japonicum* aumentou a taxa fotossintética e a biomassa total tendo sido sugerido que a taxa fotossintética seria estimulada pelos Fatores Nod devido a um aumento da atividade meristemática de um órgão dreno (Almaraz *et al.* 2007). A maior biomassa radicular verificada nas plantas do tratamento Simb poderia ter funcionado como dreno e, assim, estimulado a eficiência no uso da radiação fotossintética. Entretanto, as plantas do tratamento Simb apresentaram o maior conteúdo de clorofila e, segundo Peñuelas & Filella (1998), há uma estreita correlação entre o conteúdo de clorofila e o status do N na planta. Nossos resultados demonstraram que não só o conteúdo de clorofila, mas também o conteúdo de N foram maiores nas plantas do tratamento Simb (Figs. 2b e 3a) e isto nos permitiu inferir que a contribuição de *B. japonicum* no crescimento verificado nas plantas do tratamento Simb estaria relacionada, então, à fixação de N_2 .

A fixação do N_2 é considerada rara na subfamília Caesalpinioideae, mas para o grupo Caesalpinieae, que inclui *Dimorphandra*, está confirmado que todos os gêneros fixam N_2 no interior de nódulos (Sprent 2007). No entanto, os resultados do presente estudo sugerem que a fixação do N_2 aconteceu sem que houvesse formação de nódulos que a justificasse. A hipótese de que o aporte de N pudesse ter ocorrido pela fixação do N_2 pelas bactérias da estirpe BHCB8.5 em vida livre não foi confirmada, uma vez que a bactéria apresentou crescimento efetivo somente em um dos meios de cultura sem fonte

de N testados (Fig. 4). Entretanto, estudos revelam que em dois outros gêneros do grupo Caesalpinieae, *Gleditsia* e *Peltophorum*, as raízes podem ser invadidas pelo rizóbio, com posterior formação de correntes de infecção, mas a fixação do N₂ ocorre no interior das células das raízes, sem que haja formação de nódulos (Sprent & James 2007). Além disto, Bryan e colaboradores (1996) detectaram atividade da nitrogenase, por meio da redução do acetileno, na zona circundante às raízes de treze espécies de Fabaceae não noduladas. Assim, estes autores concluíram que a fixação do N₂ pode ocorrer em espécies das três subfamílias de Fabaceae que não formam nódulos e que este ‘mecanismo’ de fixação pode ser a base da evolução para a simbiose Fabaceae-Rhizobiaceae nodular. Considerando o expressivo aporte de N para as plantas do tratamento Simb (Fig. 3a), a hipótese de que a fixação do N₂ tenha ocorrido em vida livre ou no interior de células das raízes de *D. wilsonii* não pode ser descartada.

Nas condições ambientais em que foi realizado este trabalho não foi verificada competição por nutrientes entre *D. wilsonii* e *U. decumbens* (Fig. 3b), mas é importante ressaltar que a presença desta Poaceae (Simb + Ud) pode inibir o estabelecimento e, conseqüentemente, o efeito positivo da simbiose entre *B. japonicum* e *D. wilsonii* (Simb) (Figs. 1, 2a, 2b e 3a).

Diante de uma espécie ameaçada de extinção, sobretudo pela degradação do seu habitat natural, as informações obtidas neste trabalho poderão contribuir para o manejo de *D. wilsonii in situ*, para o estabelecimento de parâmetros que auxiliem no processo de reintrodução desta espécie e, conseqüentemente, na manutenção do seu germoplasma. No entanto, são necessários mais estudos sobre estas interações bióticas em condições ambientais mais favoráveis e, ainda, sob maior disponibilidade de N.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão da bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biologia Ambiental, Lisboa-PT e à Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte.

REFERÊNCIAS

ALMARAZ, JJ; ZHOU X; SOULEIMANOV A; SMITH D (2007) Gas exchange characteristics and dry matter accumulation of soybean treated with Nod factors. *Journal of Plant Physiology* 164:1391-1393.

ANTOUN H; BEAUCHAMP CJ; GOUSSARD N; CHABOT R; LALANDE R (1998) Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil* 204:57-67.

BÉCARD G; DOUDS DD; PFEFFER P (1992) Extensive *in vitro* hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols. *Applied Environmental Microbiology* 58:821-825.

BRYAN, JA; BERLYN, GP; GORDON, JC (1996) Toward a new concept of the evolution of symbiotic nitrogen fixation in the leguminosae. *Plant and Soil* 186:151-159.

CESCO S; MIMMO T; TONON G; TOMASI N; PINTON R; TERZANO R; NEUMANN G; WEISSKOPF L; RENELLA G; LANDI L; NANNIPIERI P (2012)

Plant-borne flavonoids release into the rhizosphere: impact on soil bio-activities related to plant nutrition: a review. *Biology and Fertility of Soils* 48(2):123-149.

CRUZ C; EGSGAARD H; TRUJILLO C; AMBUS P; REQUENA N; MARTINS-LOUÇÃO MM; JAKOBSEN I (2007) Enzymatic evidence for the key role of arginine in nitrogen translocation by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology* 144:782-792.

D'ANTONIO CM; VITOUSEK PM (1992) Biological invasions by exotic grasses, the grass/fire cycle, and global change. *Annual Review of Ecology and Systematics* 23:63-87.

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

DAKORA FD; PHILLIPS DA (2002) Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil* 245:35-47.

DANIELS BA; SKIPPER HA (1982) Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In: Schenck NC (ed) *Methods and principles of mycorrhizal research*. American Phytopathological Society, St. Paul, Minn, p 29-35.

DOUDS JUNIOR DD; GALVEZ L; JANKE RR; WAGONER P (1995) Effect of tillage and farming system upon populations and distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 52:111-118.

FERNANDES FM; FONSECA AG; KAECHHELE K; GOULART MF; MARINHO W; SOUZA HAV; QUEIROZ AR; GIORNI V; OLIVEIRA G; RODRIGUES MJ; BACELAR M; LOVATO MB (2007) Tentando evitar mais uma extinção: o caso do Faveiro de Wilson (*Dimorphandra wilsonii* Rizz.). In: *Recuperando o verde para as*

idades - A Experiência dos Jardins Botânicos Brasileiros. Rio de Janeiro: Investing in Nature, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. p. 87-98.

FERREIRA MC; HUNGRIA M (2002) Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. *Field Crops Research* 79:139-152.

FERRONATO R; MARCHESAN ED; PEZENTI E; BEDMARSKI F; ONOFRE SB (2007) Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17(2):224-230.

FONSECA MB; FRANÇA MGC; ZONTA E; GIORNI V (2010a) Crescimento inicial de *Dimorphandra wilsonii* (Fabaceae - Caesalpinioideae) em diferentes condições de fertilidade em solo de cerrado. *Acta Botanica Brasilica* 24(2):322-327.

FONSECA MB; SIMÕES JL; ISAÍAS RMS; FRANÇA MG; SCOTTI MR; JAMES EK; SPRENT J (2010b) Rhizobial and arbuscular mycorrhizal fungal symbioses in *Dimorphandra wilsonii*, a threatened Caesalpinioideae legume native to Brazilian Cerrado. In: XIII National Meeting of the Spanish Society of Nitrogen Fixation and II Portuguese-Spanish Congress on Nitrogen Fixation (Book Contributions). Zaragoza (Spain) 15-18 June, p. 127-128.

GIOVANNETTI M; MOSSE B (1980) An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84(3):484-500.

GORDON SA; WEBER RP (1951) Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology* 26:192-195.

HARTWIG UA (1998) The regulation of symbiotic N₂ fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 1(1):92-120.

HAYAT R; ALI S; UMMAY A; KHALID R; AHMED I (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology* 60(4):579-598.

HEYWOOD VH; IRIONDO JM (2003) Plant conservation: old problems, new perspective. *Biological Conservation* 113:321-335.

JAAKOLA L; HOHTOLA A (2010) Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plant space. *Plant Cell and Environment* 33:1239-1247.

KOSKE RE; GEMMA JN (1989) A modified procedure for staining roots to detect V-A mycorrhizas. *Mycological Research* 92:486-488.

LAVIN M; HERENDEEN PS and WOJCIECHOWSKI MF (2005) Evolutionary rates analysis of leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the tertiary. *Systematic Biology* 54(4):575-594.

MAGALHÃES FM; BALDANI JI; SOUTO SM; KUYKENDALL JR; DÖBEREINER J (1983) A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 55:417-430.

OLIVEIRA LA de; MAGALHÃES HP de (1999) Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. *Revista de Microbiologia* 30:203-208.

PEÑUELAS J; FILELLA I (1998) Visible and near-infrared reflectance techniques for diagnosing plant physiological status. *Trends in Plant Science* 3(4):151-156.

PEÑUELAS J; FILELLA I; GAMON JA (1995) Assessment of photosynthetic radiation-use efficiency with spectral reflectance. *New Phytologist* 131:291–296.

PIVELLO, VR (2011) Invasões biológicas no Cerrado brasileiro: efeitos da introdução de espécies exóticas sobre a biodiversidade. *Ecologia.info* 33. Disponível em: <http://www.ecologia.info/cerrado.htm>.

POUYU-ROJAS E; SIQUEIRA JO; SANTOS JGD (2006) Compatibilidade simbiótica de fungos micorrízicos arbusculares com espécies arbóreas tropicais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 30:413-424.

RICHARDSON AD; DUGAN SP; BERLYN P (2002) An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist* 153:185-194.

RIZZINI CT (1969) Espécies novas de árvores do planalto central brasileiro. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 41(2):239-244.

RIZZINI CT; MATOS FILHO A de (1986) Espécies vegetais em extinção. *Boletim da Sociedade Brasileira para a Conservação da Natureza* 21(4):99-104.

ROCKSTRÖM J; STEFFEN W; NOONEL K; PERSSON A; CHAPIM III FS; LAMBIN EF; LENTON TM; SCHEFFER M; FOLKE C; SCHELLNHUBER HJ; NYKVIST B; WIT CA de; HUGHES T; VAN DER LEEUW S; RODHE H; SÖRLIN S; SNYDER PK; COSTANZA R; SVEDIN U; FALKENMARK M; KALBERG L; CORELL W; FABRY VJ; HANSEN J; WALKER B; LIVERMAN D; RICHARDSON K; CRUTZEN P; FOLEY JA (2009) A safe operating space for humanity. *Nature* 461:472-475.

RODRIGUES CI; MAIA R; MÁGUAS C (2010) Comparing total nitrogen and crude protein content of green coffee beans (*Coffea* spp.) from different geographical origins.

Coffee Science 5(3):1-9.

SOUZA LS; VELINE ED; MARTINS D; ROSOLEM CA (2006) Efeito alelopático do capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) sobre o crescimento inicial de sete espécies de plantas cultivadas. Planta Daninha 24(4):657-668.

SPAEPEN S; VANDERLEYDEN J (2010) Auxin an plant-microbe interactions. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 1438:1-13.

SPRENT JI (2007) Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. New Phytologist 174:11-25.

SPRENT JI; JAMES EK (2007) Where do nodules and mycorrhizas fit in? Plant Physiology 144:575-581.

SUBBA-RAO NS (1977) Soil Microorganisms and Plant Growth. Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, India, p. 250.

SUBBARAO GV; ISHIKAVA T; ITO O; NAKAHARA K; WANG HY; BERRY WL (2006) A bioluminescence assay to detect nitrification inhibitors released from plant roots: a case study with *Brachiaria humidicola*. Plant and Soil 288:101-112.

VINCENT JM (1970) A practical manual for the study of root-nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific Pub. Ltd. p. 164 (International Biological Program Handbook 15).

VITOUSEK, PM; GOSZ, JR; GRIER, CC; MELILLO, JM; REINERS, WA (1982) A comparative analysis of potential nitrification and nitrate mobility in forest ecosystems. Ecological Monographs 52(2):155-177.

WALLEY FL; GERMIDA JJ (1995) Estimating the viability of vesicular-arbuscular mycorrhizae fungal spores using tetrazolium salts as vital stains. *Mycologia* 87:273-279.

WANG B; FUNAKOSHI DM; DALPÉ Y; HAMEL C. (2002) Phosphorus-32 absorption and translocation to host plants by arbuscular mycorrhizal fungi at low root-zone temperature. *Mycorrhiza* 12:93-96.

WILLIAMS DG; BARUCH Z (2000) African Grass invasion in the Americas: ecosystem consequences and role of ecophysiology. *Biological Invasions* 2:123-140.

ZANG H; PRITHIVIRAJ B; CHARLES TC; DRISCOLL BT; SMITH DL (2003) Low temperature tolerant *Bradyrhizobium japonicum* strains allowing improved nodulation and nitrogen fixation of soybean in a short season (cool spring) area. *European Journal of Agronomy* 19:205-213.

Tabela 1. Tratamentos utilizados para avaliar o crescimento de *Dimorphandra wilsonii*.

TRATAMENTO	DESCRIÇÃO
Controle	<i>Dimorphandra wilsonii</i>
Simb	<i>Dimorphandra wilsonii</i> + <i>Bradyrhizobium</i> sp + <i>Glomus etunicatum</i>
Simb + Ud	<i>Dimorphandra wilsonii</i> + <i>Bradyrhizobium</i> sp + <i>Glomus etunicatum</i> + <i>Urochloa decumbens</i>
Ud	<i>Dimorphandra wilsonii</i> + <i>Urochloa decumbens</i>

Tabela 2. Coeficiente de correlação de Pearson's entre os parâmetros de crescimento de *Dimorphandra wilsonii* ao final dos 120 dias de cultivo.

	Biomassa parte aérea	Biomassa raiz	Biomassa total	PRI	CHL	N total
Biomassa parte aérea	-	0,83**	0,96**	0,61*	0,52	0,26
Biomassa raiz	-	-	0,95**	0,55	0,69*	0,28
Biomassa total	-	-	-	0,60**	0,64*	0,28
PRI	-	-	-	-	0,65*	0,64*
CHL	-	-	-	-	-	0,54

* Correlação significativa em 0,05; ** Correlação significativa em 0,01; PRI: índice de refletância fotoquímica; CHL: índice do conteúdo de clorofila; N: nitrogênio

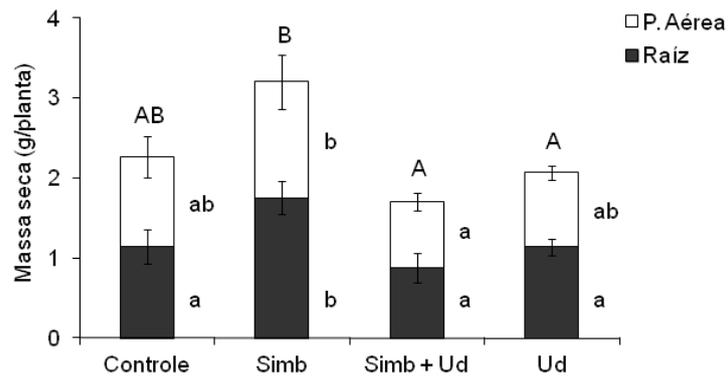


Figura 1. Efeito dos tratamentos (Controle, Simb, Simb + Ud e Ud) sobre o acúmulo de biomassa na parte aérea, raiz e total de plantas de *D. wilsonii*. Os valores representam as médias ($n = 5$ plantas) \pm desvio padrão. Letras distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos (one-way ANOVA seguida pelo teste de Duncan, $p < 0.05$). As letras minúsculas localizadas à direita das colunas do gráfico referem-se à raiz e parte aérea respectivamente. As letras maiúsculas localizadas no alto das colunas do gráfico referem-se à biomassa total.

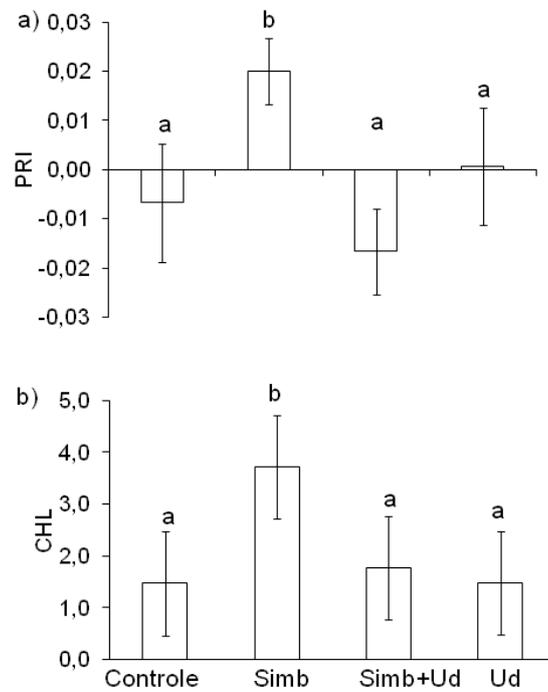


Figura 2. Efeito dos tratamentos (controle, Simb, Simb + Ud e Ud) sobre o Índice de refletância fotoquímica/PRI (a) e Índice do conteúdo de clorofila/CHL (b) de plantas de *D. wilsonii*. Os valores representam as médias (n = 5 plantas) \pm desvio padrão. Letras distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos (one-way ANOVA seguida pelo teste de Duncan, $p < 0.05$).

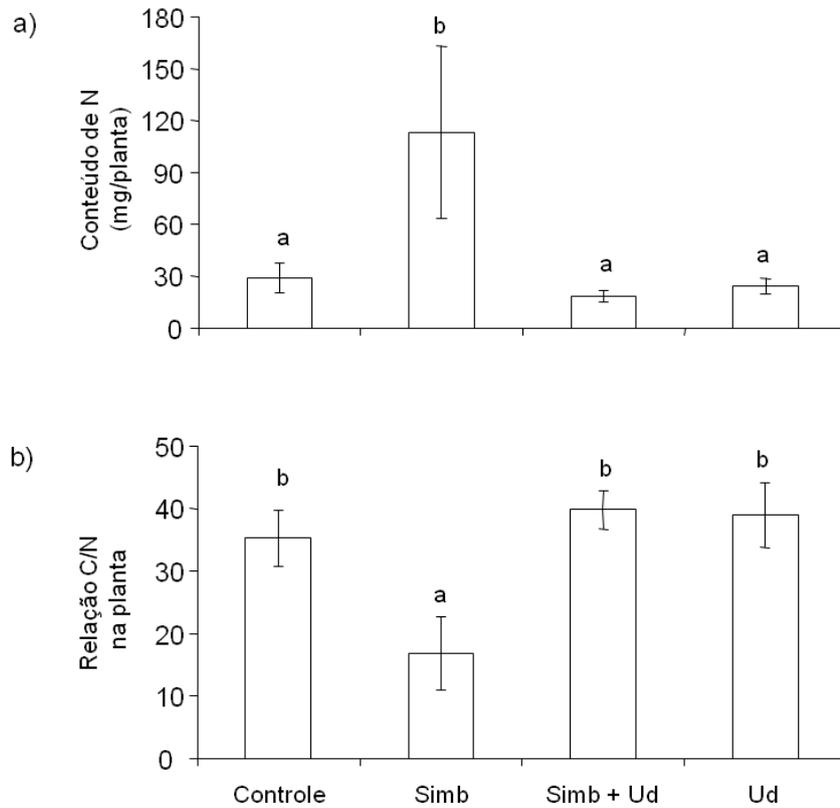


Figura 3. Efeito dos tratamentos (Controle, Simb, Simb + Ud e Ud) sobre o conteúdo de N (a) e relação C/N (b) nas plantas de *D. wilsonii*. Os valores representam as médias ($n = 5$ plantas) \pm desvio padrão. Letras distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos (one-way ANOVA seguida pelo teste de Duncan, $p < 0.05$).

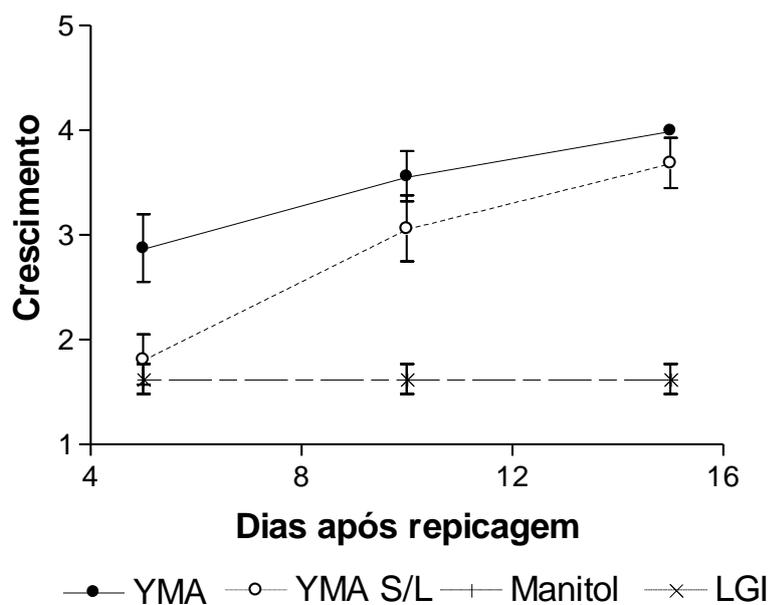


Figura 4. Efeito da ausência de fonte de nitrogênio nos meios de cultura YMA (controle), YMA S/L (YMA sem extrato de levedura), Manitol (Ashby's Manitol M706) e LGI no crescimento *in vitro* da estirpe BHICB 8.5 (*Bradyrhizobium japonicum*). A escala e intervalos de pontuação para a avaliação do crescimento foi: baixo (1,00 – 1,25), médio (1,26 – 3,00), efetivo (3,01 – 4,00). Os valores representam a pontuação média de 4 placas de meio de cultura por tratamento \pm desvio padrão.

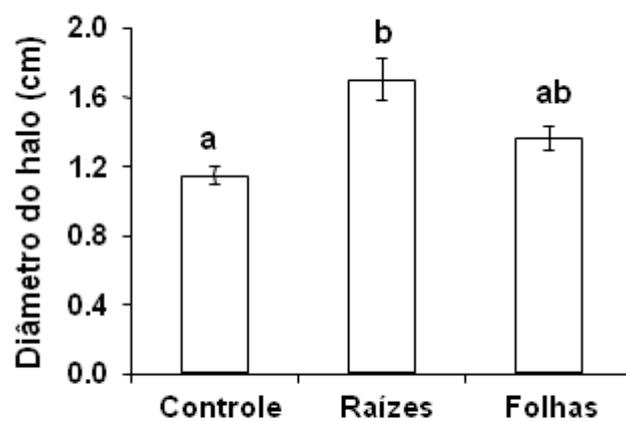


Figura 5. Efeito dos extratos aquosos de raízes e folhas de *Urochloa decumbens* sobre a estirpe BHICB 8.5 (*Bradyrhizobium japonicum*) *in vitro*. Os valores representam as médias (n = 4 placas de Petri) \pm desvio padrão. Letras distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos (one-way ANOVA seguida pelo teste de Duncan, $p < 0.05$).

CAPÍTULO II – PRESENÇA DE SIMBIONTES ATENUA
COMPETIÇÃO POR NUTRIENTES ENTRE *Urochloa decumbens* E
Dimorphandra wilsonii, ÁRVORE DO CERRADO CRITICAMENTE
AMEAÇADA DE EXTINÇÃO*

PRESENÇA DE SIMBIONTES ATENUA COMPETIÇÃO POR NUTRIENTES ENTRE *Urochloa decumbens* E *Dimorphandra wilsonii*, ÁRVORE DO CERRADO CRITICAMENTE AMEAÇADA DE EXTINÇÃO

Márcia B. Fonseca^{1,2}, Teresa Dias², Manuela Carolino², Cristina Cruz², Marcel Giovanni Costa França^{1*}

¹ Departamento de Botânica, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brazil; ² Faculdade de Ciências, Centro de Biologia Ambiental, Universidade de Lisboa, Portugal. * Autor para correspondência:

ABSTRACT

Many endemic plant species of the Brazilian Cerrado biome are threatened by extinction due to the conversion of this world biodiversity hotspot into agrosilvopastoral areas. One of these is *Dimorphandra wilsonii*, a critically threatened leguminous tree, which remaining individuals occur in areas occupied by alien grasses such as *Urochloa decumbens*. For fifty weeks, we cultivated seedlings of *D. wilsonii* in the presence or absence of this grass, co-inoculated with a strain of *Bradyrhizobium japonicum* (nitrogen fixing bacteria) isolated from *D. wilsonii* nodules, and *Glomus etunicatum* (arbuscular mycorrhizal fungi), as well as a chemical nitrification inhibitor. Plants were grown under 3 and 10 mM of ammonium. *D. wilsonii* plants grew better with higher ammonium concentration and growth indicators (biomass, nitrogen and phosphorus contents) were correlated with ammonium availability but not with that of nitrate or total inorganic nitrogen. Also, significant interactions between ammonium and the biotic treatments were observed. Although there was no nodulation or mycorrhization, the plants that grew better under 3 mM of ammonium were those co-inoculated with the

symbionts, while for the 10 mM of ammonium better growth was observed for nitrification inhibitor. Under 3 mM of ammonium the nitrogen contained in both *D. wilsonii* and *U. decumbens* plants was significantly higher than the total nitrogen added throughout the experiment pointing to nitrogen fixation despite the absence of nodules. Irrespective to the ammonium concentration, the presence of the *U. decumbens* reduced *D. wilsonii*'s growth. However, when plants were also grown in the presence of the *B. japonicum* strain and *G. etunicatum*, the negative effect of *U. decumbens* was attenuated. Our data suggests that despite the negative effect of this grass, the presence of the symbionts may attenuate the competition. This is the first study that relates initial growth of a threatened species to biotic and abiotic factors. However, longer-term studies and field observations are needed to confirm these observations.

KEY WORDS: biomass, ammonium, nitrate, phosphorus, competition.

INTRODUÇÃO

O Cerrado, um dos “hot spots” para a conservação da biodiversidade mundial (Myers *et al.* 2000), ocupa grande parte do Estado de Minas Gerais – Brasil (Brandão 2000). Este bioma é formado por um gradiente vegetacional, entre o campo limpo e o cerradão, que se desenvolve sobre solos intemperizados, ácidos, oligotróficos e com elevadas concentrações de alumínio (Ferri 1977). Desde a segunda metade do século XX a vegetação do Cerrado vem sendo convertida em áreas agrícolas para o cultivo de espécies anuais, sobretudo soja [*Glycine max* L. (Merrill)], e/ou pastagens e por causa disto espécies e/ou comunidades inteiras foram extintas ou estão em processo de extinção (Klink & Machado 2005). Uma das espécies vegetais que está criticamente ameaçada de extinção em decorrência deste processo de degradação é *Dimorphandra*

wilsonii (IUCN 2006), árvore ocorrente na transição entre o cerradão e a mata semidecídua (Rizzini, 1969). Em 1986 esta espécie já havia sido considerada em risco de extinção (Rizzini & Matos Filho 1986), restando hoje uma única população isolada em uma área de pastagem formada por espécies do gênero *Urochloa* (Poaceae) (Fernandes *et al.* 2007). Em face desta ameaça, na última década foram realizados alguns estudos que permitiram concluir que *D. wilsonii* pode crescer em solos com baixa oferta de nutrientes ao estabelecer associações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN), fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e ectomicorrízicos (ECM) que podem lhe garantir maior aporte, dentre outros nutrientes, de nitrogênio (N) e fósforo (P) (Fonseca 2007; Fonseca *et al.* 2010a; Fonseca *et al.* 2010b). Sabe-se, ainda, que a coexistência desta espécie com *U. decumbens* pode inibir o efeito positivo da simbiose entre *D. wilsonii* e uma estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (Fonseca *et al.* 2013).

Em termos de alterações abióticas, tomando por base o que se sabe sobre a conversão de ambientes florestais em áreas agrícolas (Vitouseck *et al.* 1982), a degradação do habitat de *D. wilsonii* pode ter alterado o padrão de disponibilidade de nutrientes, principalmente do N. No entanto, ainda não existem estudos acerca das fontes de N (e.g. orgânico *versus* inorgânico; nitrato *versus* amônio) que esta espécie utiliza preferencialmente e de que forma a degradação do seu habitat poderá ter alterado a disponibilidade destas fontes. Uma vez que nos ecossistemas naturais, em decorrência das razões de mineralização e imobilização, o amônio é a fonte predominante do N inorgânico à medida que os estágios sucessionais ocorrem e nos agro-ecossistemas o nitrato o é devido à predominância da nitrificação após as fertilizações (Subbarao *et al.* 2012), a nossa primeira hipótese é que *D. wilsonii*, enquanto espécie característica de estágios sucessionais tardios, utilize mais preferencialmente o amônio ao nitrato. Por

outro lado, no que se refere à tríplice simbiose Rhizobium-Fabaceae-FMA, o amônio é o principal regulador e produto primário na relação Rhizobium-Fabaceae (Patriarca *et al.* 2002) e preferencialmente transportado entre FMA-Fabaceae (Jackson *et al.* 2008). Além disto, a absorção e transferência de P pelo FMA pode favorecer diretamente o crescimento da planta hospedeira e indiretamente à fixação do N₂ (He *et al.* 2003). Assim, foram testadas duas doses de amônio - 3 mM que normalmente não é limitante e 10 mM que leva muitas espécies a apresentarem sintomas de toxicidade amoniacal (Cruz *et al.* 2011) – e espera-se que a presença destes simbiossiontes tenha um efeito benéfico no desenvolvimento de *D. wilsonii* na dose mais baixa de amônio. Visto que as Poaceae do gênero *Urochloa*, amplamente usadas na conversão do Cerrado em pastagem, possuem mecanismos para a conservação e eficiente uso do N (Souza *et al.* 2005), incluindo a produção de inibidor biológico da nitrificação (Subbarao *et al.* 2012), a nossa última hipótese é que *U. decumbens* seja uma competidora efetiva com *D. wilsonii*.

Para testar as hipóteses levantadas, considerando a variação qualitativa e quantitativa das formas do N inorgânico no ambiente florestal e na pastagem e o efeito desta para as plantas e microrganismos do solo, cultivou-se *D. wilsonii* em maior disponibilidade do N amoniacal, na presença de *Bradyrhizobium* sp.(estirpe BHCB8.5, previamente isolada de nódulos desta árvore - Fonseca *et al.* 2012), *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann – FMA (também previamente identificado colonizando as raízes desta árvore - Fonseca *et al.* 2010b) e *Urochloa decumbens* Stapf - pastagem.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental: foram testadas duas doses de amônio (3 mM e 10 mM de N sob a forma de sulfato de amônio) e cinco tratamentos: (i) *D. wilsonii*; (ii) *D. wilsonii* cultivada na presença da estirpe BHCB8.5 (*Bradyrhizobium* sp.) e *G. etunicatum*; (iii) *D. wilsonii* cultivada na presença da estirpe BHCB8.5 (*Bradyrhizobium* sp.), *G. etunicatum* e *U. decumbens*; (iv) *D. wilsonii* cultivada na presença de *U. decumbens* e (v) *D. wilsonii* cultivada na presença de um inibidor sintético de nitrificação (Nitrapyrin) (Subbarao *et al.* 2012). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial, totalizando 10 tratamentos com cinco repetições (Tab. 1). O experimento teve duração de cinquenta semanas, em estufa com ambiente não estéril, iluminação natural e temperatura ambiente variando entre 16 °C e 32 °C.

Dimorphandra wilsonii Rizz.: sementes coletadas dos indivíduos remanescentes foram escarificadas mecanicamente para quebra da dormência, desinfestadas em etanol 70% (v/v) por um minuto, posteriormente em hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) por 10 min. e lavadas abundantemente em água destilada esterilizada. Três sementes foram semeadas em vasos de 2,5 L preenchidos com uma mistura de areia e vermiculita (2 kg vaso⁻¹) na proporção de 1:1 (v/v), esterilizada em autoclave a 121 °C por 60 min. Após a germinação apenas uma plântula com aproximadamente 10 cm de altura foi mantida em cada vaso. O total de 50 plantas foi aleatoriamente dividido em dez grupos de cinco plantas que receberam ou não os inóculos e/ou plântulas de *U. decumbens* ou o inibidor de nitrificação (Nitrapyrin) (Tab. 1). A fertilização foi feita com 50 mL, duas vezes por semana, de solução de Hoagland modificada ¼ de força iônica com as seguintes concentrações finais: 3 e 10 mM de N-(NH₄)₂SO₄; 1,5 mM de K₂HPO₄; 1 mM de CaCl₂.2H₂O; 0,25 mM de MgSO₄.H₂O; 50 µM de KCl; 25 µM de H₃BO₃; 2 µM de MnSO₄. H₂O; 2 µM de ZnSO₄.7H₂O; 0,5 µM de CuSO₄.5H₂O; 0,5 µM de

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$; 20 μM de FeNaEDTA. No final do experimento as plantas de *D. wilsonii* foram coletadas, separadas em raiz e parte aérea e secas à temperatura de 60 °C até a obtenção da massa constante. Determinou-se a massa seca da massa raiz, parte aérea e total.

Urochloa decumbens Stapf: as sementes foram escarificadas em ácido sulfúrico (96%, 18 M) por 15 min. para quebra da dormência, lavadas abundantemente em água destilada esterilizada e semeadas em potes de 2,5 L contendo uma mistura de areia e vermiculita (2 kg vaso⁻¹) na proporção de 1:1 (v/v), esterilizada em autoclave a 121 °C por 60 min. Após 10 dias de cultivo quatro plântulas com 5 cm de parte aérea foram transplantadas para os vasos contendo *D. wilsonii* de acordo com os tratamentos (Tab. 1). Ao longo do experimento a parte aérea das plantas de *U. decumbens* foi desbastada quinzenalmente a 5 cm de altura do substrato, para simular a herbivoria pelo pastoreio. A biomassa das plantas inteiras coletadas ao final do experimento foi somada à biomassa removida a cada desbaste (após secagem a 60 °C, até a obtenção da massa constante).

Inoculação bacteriana e fúngica: a estirpe BHCB8.5 [*Bradyrhizobium* sp.], previamente isolada de nódulos extraídos das raízes de *D. wilsonii* cultivadas em vasos (Fonseca *et al.* 2012), foi crescida em meio de cultura YMB (Vincent 1970) a 28 °C, sob agitação constante, por 48 h. Posteriormente as células microbianas foram lavadas, centrifugadas e ressuspensas em solução salina (NaCl 0,9%) esterilizada. Os tratamentos (Tab. 1) receberam 1 mL (10^8 ufc mL⁻¹) da suspensão bacteriana inoculados na zona radicular. Ao final do experimento as raízes de *D. wilsonii* dos tratamentos inoculados foram avaliadas quanto à presença/ausência de nódulos (Tab. 2). A inoculação fúngica foi feita com 200 esporos por vaso da espécie *G. etunicatum*, obtidos da Simbyom (República Checa), aplicados na zona radicular dos tratamentos adotados

(Tab. 1). Após o cultivo, segmentos radiculares de *D. wilsonii* com 1 cm de comprimento, obtidos entre 1 a 2 cm acima do ápice radicular, foram corados (Koske & Gemma 1989) e a colonização avaliada em placa quadriculada como proposto por Giovannetti & Mosse (1980) (Tab. 2).

Aplicação do Inibidor de nitrificação - Nitrapyrin [2-cloro-6(triclorometil) piridina] (Dow Chemical Co., 93,7%): o inibidor de nitrificação foi usado não só porque a presença de amônio em ambiente não estéril propicia o desenvolvimento de uma comunidade de microrganismos nitrificantes, mas também para ser um controle positivo para a possível inibição biológica da nitrificação verificada em *U. decumbens* (Subbarao *et al.* 2012). Nos tratamentos pertinentes (Tab. 1) foi incorporado ao substrato, a 5 cm de profundidade, a dose de 2 mg kg⁻¹, que em testes de incubação em laboratório inibe a nitrificação por seis a oito semanas (Subbarao *et al.* 2006). Assim, foram aplicadas sete doses de 2 mg kg⁻¹, uma a cada sete semanas de cultivo.

Análises químicas no material vegetal: a estimativa dos conteúdos de carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P) nas plantas de *D. wilsonii* e do conteúdo de N em *U. decumbens* foi feita a partir de raízes (C e N) e folhas inteiras (P) que foram secas a 60 °C até a massa constante e moídas a pó em moinho de bolas (MM 2000). A determinação da percentagem de N e C foi feita pelo método de análise elementar (EuroVector) por combustão – DCT (Rodrigues *et al.* 2010) e a percentagem de P por digestão sulfúrica e colorimetria (Tedesco 1995). O conteúdo total de N e P por planta foi estimado a partir da biomassa radicular e da parte aérea.

Análises químicas no substrato: dado que o experimento foi realizado em vaso, apenas ao final deste (cinco dias após a última fertilização) é que foram recolhidas três amostras de 5 g de substrato para cada uma das cinco repetições por tratamento. As

amostras foram coletadas com um core de solo de 2 cm de diâmetro e 8 cm de comprimento a cerca de 3 cm da base do caule das plantas de *D. wilsonii* em três pontos afastados. Os extratos aquosos foram preparados na proporção de 1:10 m/v, agitados (Agitador Cassel) por uma hora à temperatura ambiente, centrifugados (Centrífuga Eppendorf 5403) a 5000 rpm por 20 min a 4 °C e o sobrenadante coletado e analisado colorimetricamente (espectrofotômetro Tecan Spectra Rainbow A-5082) para amônio e nitrato. O Nitrato (N-NO_3^-) foi determinado usando uma modificação do método Cataldo (Matsumura & Witjaksono 1999), o amônio (N-NH_4^+) usando a reação de Berthelot modificada (Cruz & Martins-Loução 2000) e o N inorgânico (inorgN) somando-se o N-NO_3^- e o N-NH_4^+ . Desta forma, foi possível calcular a relação entre o N inorgânico na forma reduzida e oxidada ($[\text{N-NH}_4^+]/[\text{N-NO}_3^-]$) e a fração de N inorgânico que se encontrava na forma reduzida ($[\text{N-NH}_4^+]/[\text{inorgN}]$). Nitrato, amônio e N inorgânico foram expressos em $\mu\text{g N}$ por grama de substrato seco. A relação massa fresca/massa seca foi feita em amostras de 10 g de substrato coletadas nas cinco repetições de cada tratamento.

Cálculos e Tratamento estatístico: a eficiência no uso do N (EUN) por *D. wilsonii* e *U. decumbens*, quando aplicável, foi calculada como a razão entre o N contido na(s) planta(s) e o total adicionado ao longo de 50 semanas. Assim:

$$\text{EUN (\%)} = \text{N}_{\text{planta(s)}}/\text{N}_{\text{total}} \times 100$$

Nos tratamentos Simb + Ud e Ud o N contido nas plantas de *U. decumbens* foi somado ao contido nas de *D. wilsonii*. Os 100 ml de solução nutritiva que foram adicionados semanalmente (duas vezes de 50 mL) equivalem a 0,3 e 1 mmol de N sob a forma de sulfato de amônio, ou seja, 4,2 e 14 mg de N respectivamente, o que ao longo de 50 semanas representa um valor total de 210 e 700 mg de N, respectivamente.

O efeito da presença de *U. decumbens* no crescimento de *D. wilsonii* foi quantificado em relação ao respectivo controle de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta \text{ parâmetro na presença de Ud (\%)} = (m_n - M_c)/M_c \times 100$$

Em que ‘m’ corresponde a cada valor individual (e.g. massa seca total/biomassa, conteúdos de N e P), ‘M_c’ corresponde ao valor médio do controle para cada parâmetro e ‘n’ corresponde às diferentes repetições de cada tratamento. Na presença dos simbiontes (+ Simb) o controle foi o tratamento Simb, enquanto na ausência dos simbiontes (- Simb) o controle foi o tratamento Controle (Fig. 5).

Os parâmetros relativos ao crescimento de *D. wilsonii*, à disponibilidade de N inorgânico no substrato e à presença de *U. decumbens* foram comparados para os diferentes tratamentos. Foi feita uma análise de variância para dois fatores (two-way ANOVA) para verificar a existência de interações significantes entre as doses de amônio e os tratamentos e neste caso usou-se o teste de Scheffé (p<0.05). O N contido na(s) planta(s) foi comparado com o N total adicionado usando o teste t-student (p<0.05 – Fig. 3b). A existência de correlações lineares entre os indicadores de crescimento de *D. wilsonii* (massa seca total/biomassa e conteúdos de N e P) e os fatores que poderiam tê-los influenciado foi verificada usando-se as correlações de Pearson’s. Em todos os casos, efetuaram-se análises preliminares que comprovaram a distribuição normal dos dados. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa SPSS, versão 20.0.

RESULTADOS

As plantas de *D. wilsonii* cultivadas com a dose de amônio que induz toxicidade amoniacal em muitas outras espécies (10 mM - Cruz *et al.* 2011), acumularam mais massa seca (Fig. 1) e apresentaram maiores conteúdos de nitrogênio (N – Fig. 2a) e fósforo (P – Fig. 3a) do que as cultivadas com a dose mais baixa (3 mM).

Embora a única fonte de N adicionada tenha sido o amônio, independente da dose, detectou-se nitrato no substrato de todos os tratamentos, incluindo aqueles que tinham/receberam inibidor biológico (*U. decumbens*) e químico (Nitrapyrin) da nitrificação (Subbarao *et al.* 2012) (Tab. 3). Assim, a concentração de nitrato no substrato foi elevada, sendo inclusive a forma de N inorgânico predominante (baixa $[\text{NH}_4^+]/[\text{inorgN}]$), à exceção dos tratamentos que receberam o inibidor químico da nitrificação (Nitra) (Tab. 3). Por outro lado, a concentração de amônio no substrato dos tratamentos que receberam Nitrapyrin (Nitra) foi maior do que nos demais tratamentos e a maior parte do N inorgânico (~80%) estava na forma reduzida ($[\text{NH}_4^+]/[\text{inorgN}]$ – Tab. 3). Quando a proporção do N inorgânico sob a forma de amônio ($[\text{NH}_4^+]/[\text{inorgN}]$), sua concentração individual ($[\text{NH}_4^+]$) e a razão entre esta e a do nitrato ($[\text{NH}_4^+]/[\text{NO}_3^-]$) no substrato foram correlacionadas com os indicadores de crescimento de *D. wilsonii* (massa seca total e conteúdos de N e P), independente da dose de amônio utilizada, observaram-se correlações positivas entre estas e a massa seca total (MST) e o conteúdo de N (Tab. 4). Todavia, quando a concentração de nitrato foi considerada a correlação foi negativa para a massa seca total, não tendo sido significativa para os conteúdos de N e P (Tab. 4). Por outro lado, os resultados do conteúdo de N nas plantas de *D. wilsonii* em relação ao N adicionado na fertilização (EUN – eficiência no uso do N) (Fig. 2b) sugerem que esta espécie apresenta menor

eficiência no uso do N-amônio na dose de amônio mais elevada (10 mM) do que na mais baixa (3 mM).

Uma vez que houve interação entre a dose de amônio e os tratamentos para a massa seca total (soma das partes radicular e aérea), a análise do efeito dos tratamentos foi feita para cada uma das doses. Assim, na concentração de 3 mM de amônio as plantas que cresceram mais foram as inoculadas com os simbiontes (Simb) e na ausência de *U. decumbens* (Fig. 1), apesar de não ter sido verificado neste tratamento a presença de nódulos e/ou colonização micorrízica (Tab. 2). A ausência de micorrização não pode ser atribuída à falta de viabilidade dos esporos, uma vez que as plantas de *D. wilsonii* e *U. decumbens* do tratamento Simb + Ud apresentaram-se micorrizadas (Tab. 2). Na concentração de 10 mM de amônio as plantas que cresceram mais foram as do tratamento que recebeu o Nitrapirim (Nitra) (Fig. 1). Para ambas as doses de amônio estudadas, as plantas de *D. wilsonii* que cresceram menos foram as cultivadas apenas na presença de *U. decumbens* (Ud) (Fig. 1).

Independentemente da dose de amônio utilizada, as plantas do tratamento Simb e Nitra apresentaram maior conteúdo de N (Fig. 2a) e relação N/P (Fig. 3b). Entretanto, a maior EUN foi observada no tratamento Simb + Ud que recebeu a dose de 3 mM de amônio (Fig. 2b). O maior conteúdo de P (fig. 3a) foi verificado precisamente nas plantas que apresentaram 34% de taxa de micorrização (Simb + Ud / 3 mM – Tab. 2).

As plantas de *D. wilsonii* cultivadas exclusivamente com *U. decumbens* (Ud) cresceram menos (Fig. 1) e apresentaram menores conteúdos de N e P (Fig. 2a e 3a) e maior relação C/N (valores elevados sugerem limitação por N - Fig. 3c) do que nos demais tratamentos, sugerindo assim que houve competição pelos nutrientes entre *D. wilsonii* e *U. decumbens*. Ao isolar o efeito da presença de *U. decumbens* da dos simbiontes nos

parâmetros de crescimento de *D. wilsonii* (massa seca total – MST – e conteúdos de N e P), a variação dos mesmos (Δ MST, Δ N e Δ P – Fig. 4a, b, c) mostram que na presença de simbioses as plantas de *D. wilsonii* ‘perdem’ significativamente menos nutrientes e crescem mais do que na sua ausência, isto é, houve competição por nutrientes entre as duas espécies mas a presença dos simbioses aliviou/atenuou o efeito negativo da coexistência com a Poaceae africana.

DISCUSSÃO

O maior acúmulo de biomassa verificado nas plantas cultivadas com 10 mM de amônio, sobretudo as que foram inoculadas com nitrapyrin (Nitra) (Fig. 1 e Tab. 3), evidencia a preferência de *D. wilsonii* pelo amônio, o que é corroborado ainda pelas correlações negativas entre a concentração de nitrato ($[N-NO_3^-]$) no substrato e os indicadores de crescimento considerados [massa seca total (MST) e conteúdos de nitrogênio (N) e fósforo (P) (Tab. 4)] e, ainda, pelas correlações positivas entre a concentração de amônio no substrato ($[N-NH_4^+]$), a razão entre esta e a do nitrato ($[N-NH_4^+] / [N-NO_3^-]$) e a proporção do N inorgânico sob a forma de amônio ($[N-NH_4^+] / [inorgN]$) e os mesmos indicadores de crescimento (Tab. 4). Ainda que muito pouco se saiba sobre a preferência das espécies nativas do Cerrado pelas formas de N inorgânico disponíveis em seus respectivos solos, nosso resultado foi semelhante ao verificado por Stewart *et al.* (1992) para *Pseudobombax marginatum* (secundária tardia de mata semidecídua), *Copaifera langsdorffii* (secundária tardia/clímax da transição Mata Cerrado) e *Kielmeyera coriacea* (secundária tardia de Cerrado), mas diferente para *Cedrela fissilis* (pioneira de mata semidecídua), *Rapanea guianensis* (pioneira na transição Mata-Cerrado), *Schinus terebinthifolius* (pioneira do Cerrado). Uma vez que as espécies com

preferência pelo N amoniacal são aquelas ocorrentes em solos ácidos e de estágios sucessionais tardios, devido às baixas taxas de nitrificação (Subbarao *et al.* 2012), o maior crescimento observado nas plantas de *D. wilsonii* que receberam 10 mM de amônio, sobretudo as do tratamento Nitra (Fig. 1), reflete a sua adaptação ao ambiente florestal de sua ocorrência natural, transição entre o cerradão e a mata semidecídua (Rizzini, 1969), confirmando nossa hipótese.

Ainda que fosse esperado que as plantas ocorrentes em solos ácidos e com baixa oferta de nutrientes tivessem maior EUN, visto que elas poderiam produzir mais biomassa por unidade de N adquirido (Aerts & Chapin III 2000), a menor EUN observada nas plantas de *D. wilsonii* que receberam 10 mM de amônio (Fig. 2b) igualmente sugere a adaptação desta espécie a estes tipos de solos. De acordo com Aerts & Chapin III (2000), espécies de crescimentos lento (secundárias tardias e clímax) adaptadas a solos ácidos e pobres, como é o caso de *D. wilsonii*, apresentam menor EUN quanto maior for a fertilidade do solo ou fertilização. Entretanto, é importante ressaltar que os resultados obtidos para a relação N/P, independente da dose de amônio usada, foram muito baixos ($N/P < 14$ - Güsewell 2004) (Fig. 3b). Se analisarmos este resultado tomando como referência o modelo proposto por Tilman (1997), onde a relação N/P reflete a tendência da planta em consumir os nutrientes nas proporções necessárias para sustentar o seu crescimento, poderíamos dizer que os baixos valores de N/P na biomassa de *D. wilsonii* indicariam que esta espécie tem um requerimento em N menor do que o disponibilizado na dose de 10 mM de amônio. Entretanto, o acúmulo de biomassa verificado nas plantas que receberam esta dose de amônio, comparado ao daquelas que receberam 3 mM (Fig. 1), revelam que esta espécie respondeu à maior disponibilidade de N. Esta resposta é semelhante as verificadas por Güsewell (2004) em plantas de sistemas não fertilizados, cujo grau de limitação por um nutriente foi quantificado pelo aumento no crescimento

após a fertilização, o que sugere que os baixos valores obtidos para a relação N/P em *D. wilsonii* estaria relacionado à disponibilidade do N e não à demanda fisiológica desta espécie por este nutriente. Estas informações sugerem que a baixa EUN verificada nas plantas que foram fertilizadas com 10 mM de amônio pode significar que o N-inorgânico não seja a fonte de N preferencial para *D. wilsonii*. Assumindo que esta espécie ocorre num ambiente florestal (transição cerrado/mata semidescídua) e que a ciclagem interna do N pode fazer com que a disponibilidade do N orgânico exceda à do amônio (Eviner & Chapin III 1997), a preferência de *D. wilsonii* por N orgânico não pode ser descartada. Neste sentido, a informação acerca da ocorrência de associação simbiótica entre *D. wilsonii* e ECM (Scotti *et al.* 2009), fungos reconhecidos por favorecerem a absorção de N orgânico em espécies arbóreas (Chalot & Brun 1998), reforça esta hipótese.

O maior acúmulo de biomassa verificado nas plantas do tratamento Simb na dose de 3 mM (Fig. 1), ainda que não tenha havido nodulação nem micorrização (Tab. 2), pode ter sido favorecido pela reconhecida capacidade de espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* produzirem fitormônios, solubilizadores de fosfatos, fatores Nod e vitaminas que promovem o crescimento da planta, independentemente desta ser ou não uma Fabaceae (Hayat *et al.* 2010). Entretanto, Fonseca e colaboradores (2013), trabalhando com a mesma estirpe usada no presente estudo (BHCB8.5 - *Bradyrhizobium* sp.) obtiveram resultados negativos tanto para o teste *in vitro* para a produção de ácido indol acético (AIA) quanto para a solubilização de fósforo (dados não apresentados). Diante disto, e devido ao aumento significativo no conteúdo de N nas plantas inoculadas em relação ao Controle (não inoculado), estes autores sugeriram que a fixação do N₂ havia ocorrido independentemente da formação de nódulos, isto é, no interior de células das raízes ou em vida livre. No presente estudo as plantas do

tratamento Simb (3 mM) igualmente apresentaram maior conteúdo de N do que o Controle (não inoculado) (Fig. 2a), mas os resultados obtidos para a EUN (Fig. 2b) revelaram que nestas plantas a percentagem de N contida nos tecidos era semelhante àquela disponibilizada pela fertilização, o que não nos permite afirmar se o maior aporte de N se deveu ou não à fixação do N₂. Por outro lado, os resultados da EUN (Fig. 2b) revelaram que as plantas do tratamento Simb + Ud, igualmente sem nódulos (Tab. 2), apresentaram maior quantidade de N contido no conjunto das plantas das duas espécies do que a disponibilizada pela fertilização (Fig. 2b), sugerindo que o maior aporte de N neste tratamento possa ter se dado pela fixação de N₂. A ocorrência de fixação de N₂ sem formação de nódulos foi detectada por Bryan e colaboradores (1996) ao verificarem a atividade da nitrogenase, por meio da redução do acetileno, na zona rizosférica de treze espécies de Fabaceae não noduladas. Estes autores concluíram que este ‘mecanismo’ de fixação de N₂ pode ser a base da evolução para a simbiose Fabaceae-Rhizobiaceae nodular. Cabe ressaltar que a competição por nutrientes imposta pela presença de *U. decumbens* pode ter exercido uma pressão seletiva na relação simbiótica bactéria-planta de forma a tornar a fixação de N₂ efetiva (Sachs & Simms 2008).

O maior conteúdo de P (Fig. 3a) observado nas plantas do tratamento Simb + Ud cultivadas com 3 mM de amônio pode ser explicado pela micorrização (Tab. 2), uma vez que é amplamente aceito que FMA favorecem o aumento da absorção de P (Motimer *et al.* 2008). Ainda que o conteúdo de P observado neste tratamento não tenha sido suficiente para promover o efetivo crescimento das plantas de *D. wilsonii*, provavelmente em função da competição pelos nutrientes por *U. decumbens* (Fig. 4c), ele pode ter favorecido a fixação do N₂ (Hartwig 1998). Por outro lado, a reconhecida demanda por P para a fixação do N₂ pode, por sua vez, ter estimulado a maior taxa de micorrização verificada exclusivamente neste tratamento (Antunes & Goss 2005).

A menor acumulação de biomassa (Fig. 1), menor conteúdo em N e P (Fig. 2a e 3a), maior razão C/N (Fig. 3c) e, sobretudo, a variação nos valores dos índices de crescimento (Fig. 4a, b e c) observados nas plantas de *D. wilsonii* cultivadas na presença de *U. decumbens* indicam a existência de competição entre estas espécies. É amplamente aceito que espécies de tipo fotossintético C4 são mais eficientes na carboxilação e requerem menos N, o que lhes confere vantagem competitiva frente aquelas de ciclo fotossintético C3, sobretudo em fase de plântula (Souza *et al.* 2005). Assim, é possível que a presença de *U. decumbens* no habitat atual de *D. wilsonii* comprometa o estabelecimento e a sobrevivência desta espécie em decorrência da competição por nutrientes, mas a presença dos simbiontes pode atenuar este efeito negativo no crescimento inicial da espécie arbórea quando de sua coexistência com a Poaceae africana. Ressalta-se que em função das espécies do gênero *Urochloa* apresentarem capacidade de inibição biológica da nitrificação (Subbarao *et al.* 2007) era esperado que a redução do amônio a nitrato nestes tratamentos fosse inibida, o que não foi detectado no final do experimento (Tab. 3). Um dos problemas associado ao uso de inibidores biológicos da nitrificação é a imprevisibilidade da sua ação, isto é, se a inibição da nitrificação acontecerá ou não em determinadas condições ambientais e por isto os inibidores sintéticos da nitrificação vêm sendo preferencialmente utilizados em agro-ecossistemas (Subbarao *et al.* 2012).

Nossos resultados refletem que, ainda que o habitat natural de *D. wilsonii* tenha sido desequilibrado pelo desmatamento e a introdução da Poaceae africana, esta espécie encontrou uma forma de produzir e/ou usar mais eficientemente os recursos disponíveis. Isto ressalta a capacidade adaptativa de *D. wilsonii* frente à degradação do seu habitat.

Concluindo, nossos dados sugerem que *D. wilsonii* tem o amônio como fonte preferencial de N inorgânico. Por outro lado, no ambiente degradado em que esta

espécie se encontra atualmente, a relação simbiótica entre *D. wilsonii* e uma estirpe de *B. japonicum* pode beneficiá-la, sobretudo, quando ela coexiste com *U. decumbens* e que a simbiose com FMA pode ser uma estratégia eficiente para o aporte de P. No entanto, a presença da Poaceae africana pode inibir seu crescimento e até mesmo prejudicar a sua regeneração por plântula ao competir pelos nutrientes disponíveis.

As informações obtidas neste trabalho poderão contribuir para a conservação do germoplasma de *D. wilsonii*, espécie criticamente ameaçada de extinção, tanto *in situ* quanto *ex situ*. Para além disto, estudos que investiguem a preferência desta espécie por N orgânico e as interações bióticas relacionadas a isto são ainda necessários.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão da bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biologia Ambiental, Lisboa-PT e à Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte.

REFERÊNCIAS

AERTS, R; CHAPIN III, FS (2000) The mineral nutrition of wild plants revisited: A re-evaluation of processes and patterns. *Advances in Ecological Research* 30:1-67.

ANTUNES, P; GOSS, MJ (2005) Communication in the tripartite symbiosis formed by arbuscular mycorrhizal fungi, rhizobio and legume plants: a review. *Root and Soil Management: Interactions between Roots and Soil, Agronomy Monograph 48*:199-222.

BRANDÃO, M (2000) Cerrado. In: Mendonça, MP & Lins, LV (orgs.). *Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais*. Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas, Fundação Zêo-Botânica. 55-63p.

BRYAN, JA; BERLYN, GP; GORDON, JC (1996) Toward a new concept of the evolution of symbiotic nitrogen fixation in the leguminosae. *Plant and Soil* 186:151-159.

CHALOT, M; BRUN, A (1998) Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *FEMS Microbiology Reviews* 22:21-44.

CRUZ, C; MARTINS-LOUÇÃO, MA (2000) Nitrogen in a sustainable environment: a matter of integration. *Nitrogen in a Sustainable Ecosystem* (eds M.A. Martins-Loução & S.H. Lips). Backhuys, The Netherlands. p. 415-419.

CRUZ, C; DOMÍNGUES-VALDIVIA, MD; APARICIO-TEJO, PM; LAMSFUS, C; BIO, A; MARTINS-LOUÇÃO, MA; MORAN, JF (2011) Intra-specific variation in pea responses to ammonium nutrition leads to different degrees of tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 70:233-243.

EVINER, VT; CHAPIN III, FS (1997) Plant-microbial interaction. *Nature* 385:26-27.

FERNANDES, FM; FONSECA, AG; KAECELE, K; GOULART, MF; MARINHO, W; SOUZA, HAV; QUEIROZ, AR; GIORNI, V; OLIVEIRA, G; RODRIGUES, MJ; BACELAR, M; LOVATO, MB (2007) Tentando evitar mais uma extinção: o caso do Faveiro de Wilson (*Dimorphandra wilsonii* Rizz.). In: *Recuperando o verde para as*

idades - A Experiência dos Jardins Botânicos Brasileiros. Investing in Nature - Rio de Janeiro/Brasil. p. 87-98.

FERRI, MG (1977) Ecologia dos cerrados. In: IV Simpósio sobre o cerrado. Editora Itatiaia, Belo Horizonte; EDUSP, São Paulo. p. 15-33.

FONSECA, MB (2007) Influência da fertilidade do solo e caracterização da fixação biológica de N₂ para o crescimento de *Dimorphandra wilsonii* Rizz. (Fabaceae – Caesalpinioideae). Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais.

FONSECA, MB; FRANÇA, MGC; ZONTA, E; GIORNI, V (2010a) Crescimento inicial de *Dimorphandra wilsonii* (Fabaceae - Caesalpinioideae) em diferentes condições de fertilidade em solo de cerrado. Acta Botanica Brasilica 24(2):322-327.

FONSECA, MB; SIMÕES, JL; ISAÍAS, RMS; FRANÇA, MG; SCOTTI, MR; JAMES, EK; SPRENT J (2010b) Rhizobial and arbuscular mycorrhizal fungal symbioses in *Dimorphandra wilsonii*, a threatened Caesalpinioideae legume native to Brazilian Cerrado. In: Book Contributions of XIII National Meeting of the Spanish Society of Nitrogen Fixation and II Portuguese-Spanish Congress on Nitrogen Fixation. Zaragoza (Spain). p. 127-128.

FONSECA, MB; CAROLINO, MMSSL; DIAS, T; CRUZ, C; FRANÇA, MGC (2013) Early growth of Brazilian tree *Dimorphandra wilsonii* is also threatened by African grass *Urochloa decumbens*. Journal of Plant Interactions. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/17429145.2013.770085>

GIOVANNETTI, M; MOSSE, B (1980) An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84(3):484-500.

GÜSEWELL, S (2004) N : P ratios in terrestrial plants: variation and functional significance. *New Phytologist* 164:243-266.

HARTWIG, UA (1998) The regulation of symbiotic N₂ fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 1(1):92-120

HAYAT, R; ALI, S; UMMAY, A; KHALID, R; AHMED, I (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology* 60(4):579-598.

HE, X-H; CRITCHLEY, C; BLEDSOE, C (2003) Nitrogen transfer within and between plants through common mycorrhizal networks (CMNs). *Critical Reviews in Plant sciences* 22(6):531-567.

IUCN (2006) IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>.

JACKSON, LE; BURGER, M; CAVAGNARO, TR (2008) Roots, Nitrogen transformations and ecosystem services. *Annual Reviews of Plant Biology* 59:341-363.

KLINK, CA; MACHADO, RB (2005) A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade* 1(1):147-155.

KOSKE, RE; GEMMA, JN (1989) A modified procedure for staining roots to detect V-A mycorrhizas. *Mycological Research* 92:486-488.

MATSUMURA, S; WITJAKSONO, G (1999) Modification of the Cataldo method for the determination of nitrate in soil extracts by potassium chloride. *Soil, Science & Plant Nutrition* 45:231-235.

MORTIMER, PE; PÉRES-FERNANDEZ, MA; VALENTINE, AJ (2008) The role of arbuscular mycorrhizal colonization in the carbon and nutrient economy of the tripartite symbiosis with nodulated *Phaseolus vulgaris*. *Soil Biology & Biochemistry* 40:1019-1027.

MYERS, NRA; MITTERMEIER, CG; FONSECA, GAB; KENT, J (2000) Biodiversity hot spots for conservation priorities. *Nature* 403:853–858.

PATRIARCA, EJ; TATÈ, R; LACCARINO, M (2002) Key role of NH_4^+ metabolism in rhizobium-plant symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Review* 66(2):203-222.

RIZZINI, CT (1969) Espécies novas de árvores do planalto central brasileiro. *An. Acad. Brasil. Ciênc.* 41(2):239-244.

RIZZINI, CT; MATOS FILHO, A de (1986) Espécies vegetais em extinção. *Boletim da Sociedade Brasileira para a Conservação da Natureza* 21(4):99-104.

RODRIGUES, CI; MAIA, R; MÁGUAS, C (2010) Comparing total nitrogen and crude protein content of green coffee beans (*Coffea* spp.) from different geographical origins. *Coffee Science* 5(3):1-9.

SACHS, JL; SIMMS, EL (2008) The origins of uncooperative rhizobia. *Oikos* 117:961-966.

SCOTTI, MR; KASUYA, C; CRUZ, C; BACELAR, M; GOMES, M; MIRANDA, P; PEREIRA, RA; SPRENT, JI (2009) Multiple associations involving ectomycorrhizal and endomycorrhizal fungi, nitrogen fixing bacteria and the leguminous species *Dimorphandra wilsonii*, a threatened species from the Brazilian Cerrado. In: Book of Abstracts III International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2009). Lisbon (Portugal). p. 220.

SOUZA, A; MORAES, MG; RIBEIRO, RCLF (2005) Gramíneas do cerrado: carboidratos não-estruturais e aspectos ecofisiológicos. *Acta Botanica Brasilica*. 19(1):81-90.

STEWART, GR; JOLY, CA; SMIRNOFF, N (1992) Partitioning of inorganic nitrogen assimilation between the roots and shoots of cerrado and forest trees of contrasting plant communities of south east Brazil. *Oecologia* 91:511-517.

SUBBARAO, GV; RONDON, M; ITO, O; ISHIKAWA, T; RAO, IM; NAKAHARA, K; LASCANO, C; BERRY, W L (2007) Biological nitrification inhibition (BNI)—Is it a widespread phenomenon? *Plant and Soil* 294:5-18.

SUBBARAO, GV; SAHRAWAT, KL; NAKAHARA, K; ISHIKAWA, T; KISHII, M; RAO, IM; HASH, CT; GEORGE, TS; RAO PS; NARDI, P; BONNETT, D; BERRY, W; SUENAGA, K; LATA, JC (2012) Biological nitrification inhibition – A novel strategy to regulate nitrification in agricultural systems. *Advances in Agronomy* 114: 249-306.

TEDESCO, MJ (1995) Análise de solo, plantas e outros materiais. UFRGS - Depto. de solos, Porto Alegre. p. 45-57.

TILMAN, D (1997) Mechanisms of plant competition. *Plant Ecology* 2:239-261.

VINCENT JM (1970) A practical manual for the study of root-nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific Pub. Ltd. (International Biological Program Handbook 15). p. 164.

VITOUSEK, PM, GOSZ, JR; GRIER, CC; MELILLO, JM; REINERS, WA (1982) A comparative analysis of potential nitrification and nitrate mobility in forest ecosystems. Ecological Monographs 52(2):155-177.

Tabela 1. Descrição dos tratamentos utilizados para avaliação do crescimento de *Dimorphandra wilsonii*.

Tratamento	Dose de N-NH ₄ ⁺	Descrição
Controle	3 mM	<i>D. wilsonii</i>
	10 mM	
Simb	3 mM	<i>D. wilsonii</i> + <i>B. japonicum</i> + <i>G. etunicatum</i>
	10 mM	
Simb + Ud	3 mM	<i>D. wilsonii</i> + <i>B. japonicum</i> + <i>G. etunicatum</i> + <i>U. decumbens</i>
	10 mM	
Ud	3 mM	<i>D. wilsonii</i> + <i>U. decumbens</i>
	10 mM	
Nitra	3 mM	<i>D. wilsonii</i> + Nitrapyrin
	10 mM	

Tabela 2. Ocorrência de nodulação e colonização micorrízica nas raízes de *Dimorphandra wilsonii* e *Urochloa decumbens* dos tratamentos inoculados com a estirpe *Bradyrhizobium japonicum* e *Glomus etunicatum*. Os dados correspondem aos valores médios (n = 5 ± erro padrão).

Tratamento	Dose de N-NH ₄ ⁺	Nodulação		Colonização (%)	
		<i>D. wilsonii</i>	<i>U. decumbens</i>	<i>D. wilsonii</i>	<i>U. decumbens</i>
Simb	3 mM	0	na*	0	0
	10 mM	0	na	0	0
Simb + Ud	3 mM	0	na	34 ± 2	57 ± 4
	10 mM	0	na	0	0

*na = não aplicável.

Tabela 3: Efeito dos tratamentos (Controle, Simb, Simb + Ud, Ud e Nitra) e da dose de amônio (3 e 10 mM) na concentração, razão e proporção de amônio e nitrato no substrato de cultivo de *D. wilsonii*. Letras distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos (one-way ANOVA seguida pelo teste de Scheffé, $p < 0.05$). Não existem interações significativas entre tratamento e dose ($p < 0.05$). Os valores representam a média ($n = 5$ plantas) \pm erro padrão.

Tratamento	Dose (NH_4^+)	[N- NH_4^+] ($\mu\text{g g}^{-1}$)	[N- NO_3^-] ($\mu\text{g g}^{-1}$)	[inorgN] ($\mu\text{g g}^{-1}$)	[N- NH_4^+] / [N- NO_3^-]	[N- NH_4^+] / [inorgN]
Controle	3 mM	1,2 \pm 0,0	4,4 \pm 0,1	5,6 \pm 0,1	0,3 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0
	10 mM	1,3 \pm 0,1	4,6 \pm 0,0	5,8 \pm 0,1	0,3 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0
Simb	3 mM	1,0 \pm 0,1	4,5 \pm 0,3	5,5 \pm 0,3	0,2 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0
	10 mM	1,4 \pm 0,0	4,9 \pm 0,1	6,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0
Simb + Ud	3 mM	0,6 \pm 0,1	4,6 \pm 0,1	5,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0
	10 mM	0,7 \pm 0,1	4,6 \pm 0,0	5,4 \pm 0,2	0,2 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0
Ud	3 mM	0,5 \pm 0,1	4,5 \pm 0,1	5,0 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0
	10 mM	0,8 \pm 0,1	4,6 \pm 0,1	5,3 \pm 0,2	0,2 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0
Nitra	3 mM	1,5 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	2,0 \pm 0,2	3,2 \pm 0,3	0,8 \pm 0,0
	10 mM	1,7 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1	2,1 \pm 0,1	3,7 \pm 0,8	0,8 \pm 0,0

[N- NH_4^+] = amônio, [N- NO_3^-] = nitrato, [inorgN] = N inorgânico total, [N- NH_4^+]/[N- NO_3^-] = razão entre amônio e nitrato, [N- NH_4^+]/[inorgN] = proporção do N inorgânico que esta na forma reduzida (NH_4^+)

Tabela 4. Correlações de Pearson's entre os indicadores de crescimento de *D. wilsonii* (massa seca total (biomassa) e conteúdos de N e P) e os fatores que potencialmente o influenciaram.

	MST	Conteúdo N	Conteúdo P
[N-NH ₄ ⁺]	0,71 ^{**}	0,60 ^{**}	0,17
[N-NO ₃ ⁻]	-0,43 [*]	-0,31	0,06
[inorgN]	-0,29	-0,18	0,12
[N-NH ₄ ⁺]/[N-NO ₃ ⁻]	0,48 ^{**}	0,34	0,02
[N-NH ₄ ⁺]/[inorgN]	0,54 ^{**}	0,42 [*]	0,06
MST	-	0,86 ^{**}	0,54 ^{**}
Conteúdo N	0,86 ^{**}	-	0,46 [*]
EUN	0,08	0,38 [*]	0,04
Conteúdo P	0,54 ^{**}	0,46 [*]	-
C/N	-0,58 ^{**}	-0,83 ^{**}	-0,48 ^{**}
N/P	0,67 ^{**}	0,87 ^{**}	0,04

[N-NH₄⁺] = amônio no substrato, [N-NO₃⁻] = nitrato no substrato, [inorgN] = N inorgânico total no substrato, [N-NH₄⁺]/[N-NO₃⁻] = razão entre amônio e nitrato no substrato, [N-NH₄⁺]/[inorgN] = proporção do N inorgânico no substrato que está na forma reduzida (NH₄⁺), MST = massa seca total = biomassa total, Conteúdo N = conteúdo de nitrogênio em *D. wilsonii*, EUN = eficiência de *D. wilsonii* no uso do N, Conteúdo P = conteúdo de fósforo em *D. wilsonii*, C/N = relação carbono e nitrogênio em *D. wilsonii* e N/P = relação nitrogênio e fósforo em *D. wilsonii*. ** Correlação significativa em 0.01; * Correlação significativa em 0.05

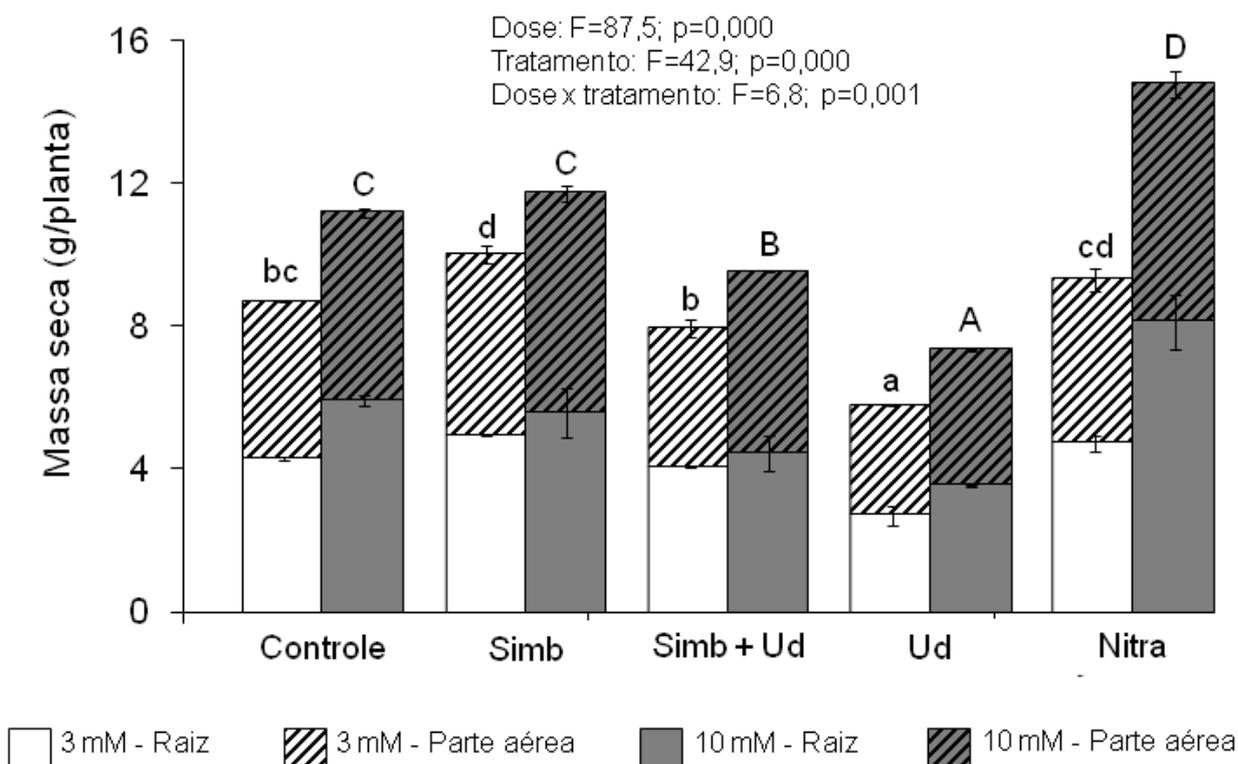


Figura 1 – Efeito dos tratamentos (Controle, Simb, Simb+Ud, Ud e Nitra) e da dose de amônio (3 e 10 mM) na acumulação da massa seca total/biomassa (raiz + parte aérea) de *D. wilsonii*. Letras distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos (one-way ANOVA para cada dose seguida pelo teste de Scheffé, $p < 0.05$). As barras representam as médias ($n = 5$ plantas) \pm erro padrão.

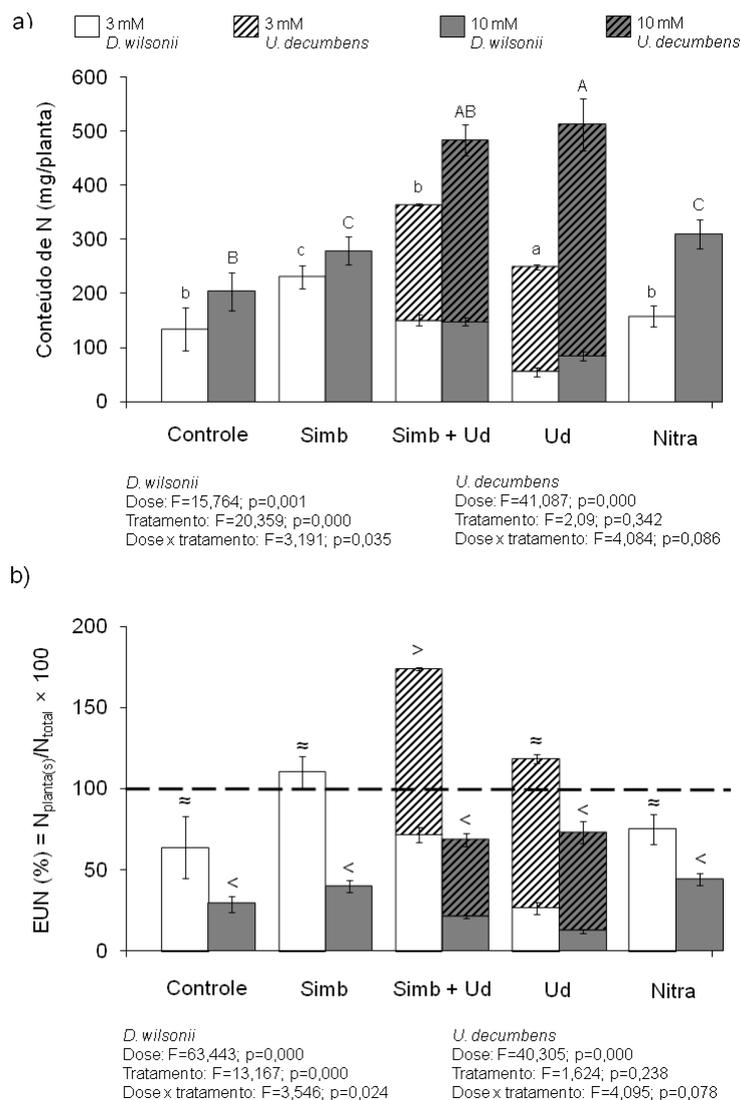


Figura 2 – Efeito dos tratamentos (Controle, Simb, Simb+Ud, Ud e Nitra) e da dose de amônio (3 e 10 mM) no conteúdo de Nitrogênio (N) e na Eficiência no uso de N (EUN) em *D. wilsonii* e *U. decumbens* (quando aplicável). Letras distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos (one-way ANOVA seguida pelo teste de Scheffé, $p < 0.05$). \approx , a % de N contida na planta não é significativamente diferente da % de N fornecida pela fertilização; $<$, a % de N contida na planta é significativamente menor do que a % de N fornecido pela fertilização; $>$, a % de N contida na planta é significativamente maior do que a % de N fornecido pela fertilização. As barras representam as médias ($n = 5$ plantas) \pm erro padrão.

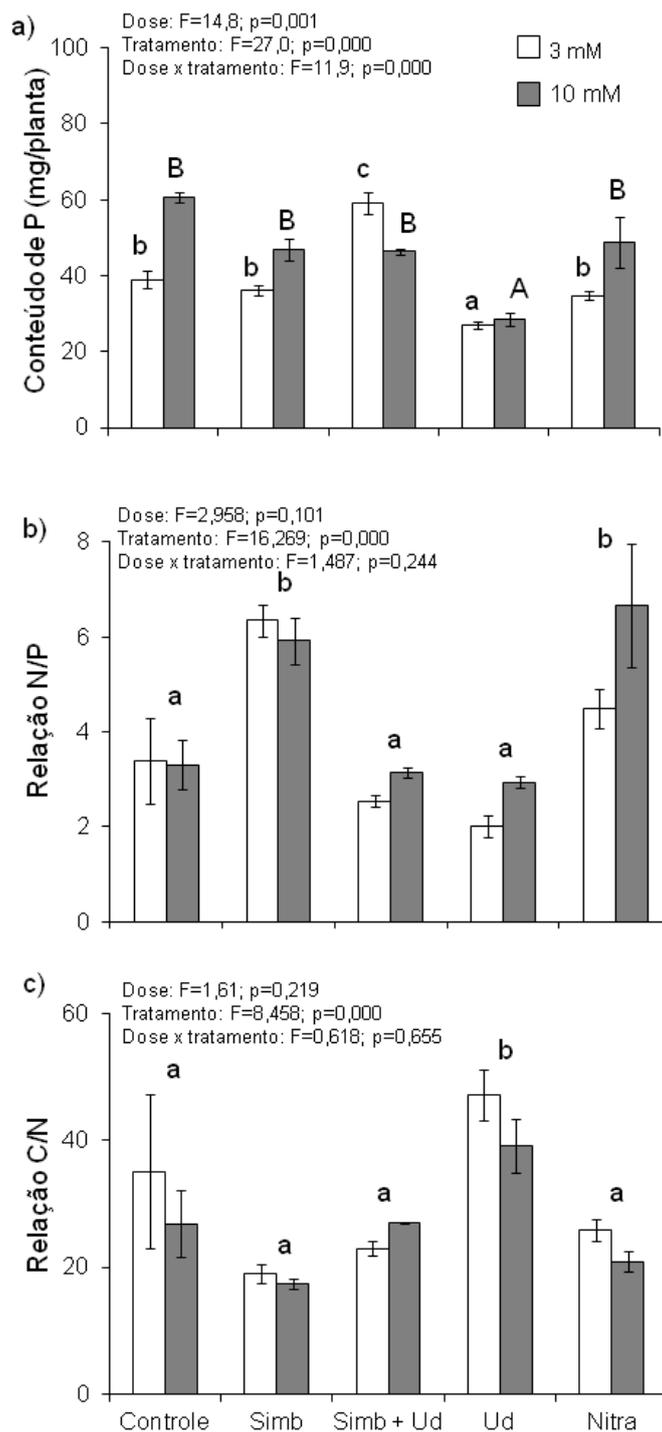


Figura 3 – Efeito dos tratamentos (Controle, Simb, Simb+Ud, Ud e Nitra) e da dose de amônio (3 e 10 mM) no conteúdo de P e relações N/P e C/N em *D. wilsonii*. Letras distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos (two-way ANOVA e quando necessário one-way ANOVA seguida pelo teste de Scheffé, $p < 0.05$). As barras representam as médias ($n = 5$ plantas) \pm erro padrão.

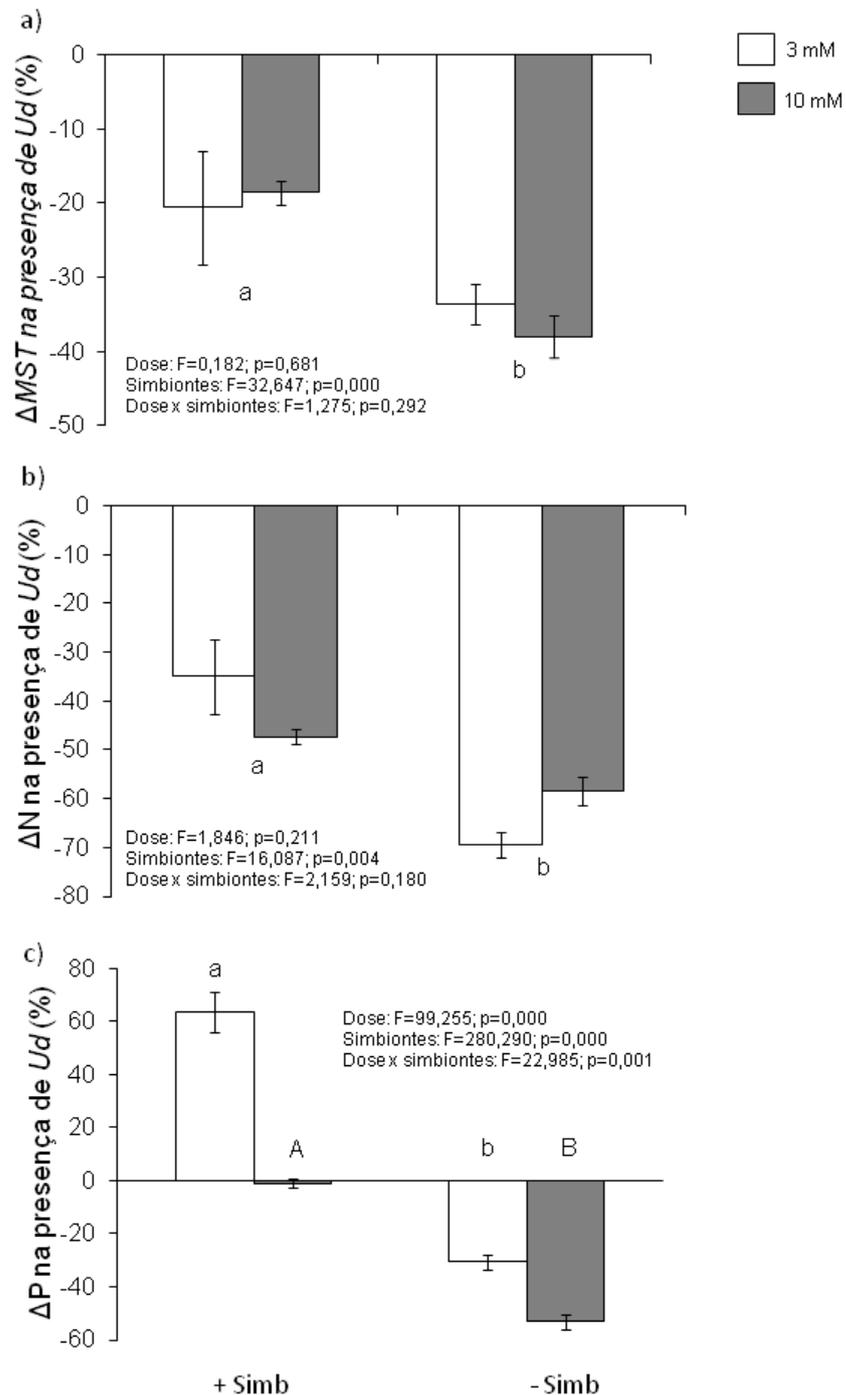


Figura 4 – Efeito da presença de *U. decumbens* no crescimento de *D. wilsonii* cultivadas nas duas doses de amônio (3 e 10 mM) na presença e ausência dos simbiotes (+ Simb e – Simb, respectivamente). A variação devida à presença de *U. decumbens* foi quantificada para a massa seca total (Δ MST) e conteúdos de N (Δ N) e P (Δ P) em relação ao respectivo controle (Simb+Ud e Controle – ver material e métodos). Em Δ P houve interação entre a presença/ausência de simbiotes e a dose de N ($P < 0.05$). As barras representam as médias ($n = 5$ plantas) \pm erro padrão.

DISCUSSÃO GERAL

DISCUSSÃO GERAL

Esta pesquisa abordou a importância de interações bióticas e abióticas no desenvolvimento de *D. wilsonii*. A conversão do Cerrado em pastagem alterou o funcionamento do ecossistema (Klink & Machado 2005), principalmente o padrão de disponibilidade do nitrogênio (N) (Vitouseck *et al.* 1982). Nesta perspectiva, os experimentos realizados buscaram verificar a(s) resposta(s) de *D. wilsonii* em relação à disponibilidade de N sob a forma de N-amônio, a presença/ausência de simbiontes e a presença/ausência de uma Poaceae africana de elevado potencial invasor.

A questão fundamental abordada foi de que forma a disponibilidade em N amoniacal influencia o crescimento e as estratégias de uso do N por *D. wilsonii*, nomeadamente através do estabelecimento de relações simbióticas (com bactérias fixadoras de N₂ e com FMA) e à coexistência com outra espécie potencialmente competidora. Com base nisto, foram avaliados parâmetros fisiológicos e/ou químicos das plantas e simbiontes envolvidos nos ‘sistemas’ (Caps. 1 e 2). Em relação ao substrato em que as plantas cresceram avaliou-se a disponibilidade das frações de N inorgânico (Cap. 2). Uma vez que para estas análises seria necessária a retirada de efetivo conteúdo de substrato e isto poderia comprometer o ‘funcionamento’ dos ‘sistemas’, estas foram realizadas somente ao final do experimento e, diante disto, os resultados verificados podem não corresponder à dinâmica química no substrato ao longo de todo o experimento. Os resultados também foram discutidos no âmbito de estratégias de conservação desta espécie criticamente ameaçada de extinção (IUCN 2006), sendo apresentadas sugestões de medidas de manejo e linhas de pesquisas futuras.

Contextualização dos resultados

Simbiontes

FBN – *Bradyrhizobium* sp.

No presente estudo, a identificação molecular da estirpe BHCB8.5 isolada a partir de nódulos de plantas de *D. wilsonii* (Fonseca *et al.* 2012) foi feita comparando-se um fragmento do gene 16S rDNA da bactéria com sequências depositadas no GeneBank (Program BLASTN 2.2.25+). A similaridade genética entre esta estirpe e a espécie *Bradyrhizobium japonicum* bv. *glycinearum* (USDA 110) foi de 99% (Cap. 1), o que é convergente com o resultado obtido por Fonseca e colaboradores (2012). Entretanto, estes autores, a partir da análise das sequências da região intergênica (ITS) 16S-23S rDNA constataram que a estirpe BHCB8.5, na verdade, é uma espécie nova de *Bradyrhizobium*. A aparente divergência destes resultados se justifica pela presença de domínios variáveis nas sequências dos genes que codificam a região 16S-23S rDNA, o que permite maior precisão na diferenciação das espécies deste gênero (Fonseca *et al.* 2012).

Ainda em relação à estirpe BHCB8.5, não era esperado que as plantas dos tratamentos Simb e Simb + Ud (Caps. 1 e 2) não formassem nódulos, principalmente em função da média de 18 nódulos nas raízes de plantas de *D. wilsonii* inoculadas com a estirpe BHCB8.5 verificada por Fonseca e colaboradores (2012). Entretanto, estes autores, investigando as etapas iniciais da formação de nódulos em *D. wilsonii*, constataram que além da infecção via pelos radiculares houve ainda, numa escala relativamente grande e um pouco desorganizada, a invasão, por meio de grandes correntes de infecção, de células epidérmicas e corticais adjacentes. Além disto, estes autores verificaram que os bacteroides dentro das correntes de infecção permanentes eram capazes de expressar a nitrogenase, de fixar N₂ atmosférico e transferir o N fixado para a planta hospedeira. Portanto, a hipótese de que a fixação do N₂ tenha ocorrido

no interior das células das raízes das plantas dos tratamentos Simb (1,5 mM de amônio - Cap. 1) e Simb + Ud (3 mM de amônio – Cap.2) não pode ser descartada.

Sabendo que a relação entre *D. wilsonii* e a estirpe BHC8.5 apresenta alto grau de especificidade, a ponto de poder ser considerada exclusiva (Fonseca *et al.* 2012), a fixação do N₂ sugerida para os tratamentos Simb (1,5 mM de amônio - Cap. 1) e Simb + Ud (3 mM de amônio – Cap.2) pode ter sido modulada pela pressão seletiva imposta pela baixa disponibilidade de N (baixa disponibilidade de amônio - Cap. 1) e pela competição pelo N imposta pela presença de *U. decumbens* (Cap. 2), refletindo, como sugerido por Fonseca e colaboradores (2012), uma possível dependência desta relação simbiótica para o aporte de N em ambientes em que a disponibilidade deste nutriente está limitada.

FMA – *Glomus etunicatum*

Em relação à associação entre *D. wilsonii* e FMA, os resultados apresentados neste trabalho (Cap. 2) são convergentes com aqueles que demonstram o efeito positivo do FMA no aporte de P para a fixação do N₂ (Jia *et al.* 2004). É interessante ressaltar que Fonseca e colaboradores (2010b) verificaram que *D. wilsonii* também pode ser colonizada por ECM. Via de regra, as espécies de estágios sucessionais tardios (secundárias tardias e clímax) de ambientes florestais do Cerrado, em função da variação das taxas de ciclagem de nutrientes na estação úmida e seca podem ser micotróficas facultativas (Aidar *et al.* 2004) e as espécies da subfamília Caesalpinioideae deste grupo ecológico também podem ser infectadas por ECM (Sprent & James 2007). Estas informações sugerem a existência de certa especificidade entre fungos micorrízicos e *D. wilsonii* para o acesso aos estoques, principalmente, de P em sua área de ocorrência (Cerrado), originalmente limitado neste nutriente (Goedert 1993).

Aspectos relevantes

- Quando a presença de N e/ou P é limitada, a presença de bactérias fixadoras de N₂ e FMA contribuem significativamente para o crescimento de *D. wilsonii*.

Recomendações

- Que as plantas de *D. wilsonii* destinadas a programas de conservação *in situ* e *ex situ* sejam inoculadas com bactérias fixadoras de N₂ e FMA.
- Em função da especificidade destas relações simbióticas, sugere-se que os respectivos inóculos sejam produzidos a partir de material (nódulos e esporos) coletado na região rizosférica das plantas remanescentes de *D. wilsonii*. Caso isto não seja possível, sugere-se que os inóculos sejam produzidos a partir de amostras de solo coletadas em áreas de ambientes florestais de Cerrado (cerradão e mata semidecídua) preservados.

Urochloa decumbens

Neste trabalho verificou-se que a presença de *U. decumbens* pode comprometer o crescimento de *D. wilsonii* pela competição pelos nutrientes do solo (Cap. 2). Ainda que a forte competitividade das espécies de Poaceae africana por nutrientes seja amplamente aceita (Souza *et al.* 2006), são escassos os trabalhos que avaliam diretamente a competição por nutrientes entre Poaceae africanas e espécies arbóreas nativas do Cerrado e dentre estes poucos trabalhos os resultados obtidos neste estudo são semelhantes àqueles de Pires e colaboradores (2012) para as espécies de Cerrado *Hymenaea stigonocarpa* e *Dipteryx alata*. A maior parte dos trabalhos disponíveis está relacionada à regeneração de espécies nativas e, neste sentido, Hoffmann & Haridasan (2008) verificaram que a espécie *Melinis minutiflora* compromete o estabelecimento de plântulas de espécies arbóreas pioneiras, principalmente,

em função da competição pela luz. No presente estudo a competição pela luz provavelmente não foi um fator limitante devido às podas sucessivas, mas não seria equivocado afirmar que isto é passível de ocorrer com *D. wilsonii* em situação de campo, principalmente, em função do crescimento lento comum às espécies de estágios tardios da sucessão (Franco 2002).

Verificou-se, ainda, que *U. decumbens* pode inibir o crescimento da bactéria fixadora de N₂ *in vitro* (estirpe BHCB8.5 – Cap. 1) e assim afetar indiretamente o crescimento de *D. wilsonii*. O potencial alelopático de espécies de Poaceae africana está bem demonstrado em plantas, principalmente, em relação à inibição da germinação de sementes (Ribeiro *et al.* 2012). Em relação à ação alelopática das espécies deste grupo em microrganismos do solo, Subbarao e colaboradores (2012) verificaram que a substância brachilactona, um diterpeno cíclico, liberada por espécies de *Urochloa*, inibe a atividade de nitrificação em espécies de *Nitrosomonas* por meio do bloqueio da ação das enzimas amônia monoxigenase (AMO) e hidroxalamina oxigenase (HAO). Entretanto, não há registro na literatura sobre o potencial de *U. decumbens* em inibir o crescimento de espécies de *Bradyrhizobium*, não sendo possível especular acerca da substância e/ou mecanismo de ação pelo qual o crescimento da estirpe BHCB8.5 foi inibido (Cap. 1).

Aspectos relevantes

- A presença de *U. decumbens* é prejudicial ao crescimento de *D. wilsonii*, diretamente, pela competição direta pelos nutrientes do solo e, indiretamente, por inibir o crescimento da bactéria fixadora de N₂ e, conseqüentemente, o estabelecimento da simbiose.

Recomendações

- Em relação ao manejo da área de distribuição dos indivíduos remanescentes de *D. wilsonii*, sugere-se que as plantas de *U. decumbens* sejam eliminadas integralmente do solo, ainda que esta ação seja de difícil execução e tenha custo operacional alto. Ressalta-se que a remoção integral da Poaceae é imprescindível em caso de reintrodução de mudas de *D. wilsonii*, não só em função da competição pelos nutrientes, mas também pela inibição do crescimento das bactérias fixadora de N₂.

Concentração de N-amônio

Ainda que os períodos de adição de solução nutritiva aplicados neste trabalho tenham sido diferentes (Cap. 1 – 32 semanas; Cap. 2 – 50 semanas) e guardando os limites impostos por isto, comparou-se o efeito das concentrações de amônio (Cap. 1 – 1,5 mM; Cap. 2 – 3 e 10 mM) no crescimento de *D. wilsonii*, sendo verificado que esta espécie apresentou maior acúmulo de biomassa em resposta às maiores concentrações de N-amônio das fertilizações. Esta resposta corrobora os resultados obtidos por Fonseca e colaboradores (2010a) para esta mesma espécie e, ainda, é semelhante à verificada para *Tabebuia impetiginosa* (Souza *et al.* 2006) e *Enterolobium contortisiliquium* (Duboc & Guerrini 2007), duas outras espécies secundárias tardias a clímax do Cerrado.

A única fonte de N adicionada em ambos os experimentos foi o amônio, mas no segundo experimento (Cap. 2) detectou-se que, independentemente da concentração, o nitrato foi a forma de N inorgânico predominante no substrato, à exceção dos tratamentos que receberam o inibidor químico da nitrificação, e correlacionou-se negativamente com a biomassa total. Uma vez que o maior acúmulo de biomassa em *D. wilsonii* foi verificado nas plantas que

receberam 10 mM de amônio e foram inoculadas com o inibidor sintético da nitrificação - (maior $[N-NH_4^+]$) - e sabendo que espécies pioneiras assimilam preferencialmente nitrato, enquanto espécies secundárias tardias e clímax assimilam preferencialmente amônio (Stewart *et al.* 1992), foi possível inferir que *D. wilsonii* tem preferência pelo amônio, o que igualmente foi verificado para *Nectandra megapotamica* e *Ocotea catharinensis* (secundárias tardias do Cerrado) e diferente do obtido para *Cecropia pachystachya* e *Trema micrantha* (pioneiras do Cerrado) (Aidar *et al.* 2003). Este resultado confirma que *D. wilsonii* é uma espécie de estágios tardios da sucessão no Cerrado e reflete sua adaptação aos solos ácidos e com baixas taxas de nitrificação observados nestes ambientes (Subbarao *et al.* 2012).

Ressaltando que as condições em que as plantas cresceram e a duração dos experimentos a que se referem os capítulos 1 e 2 não foram as mesmas, comparou-se a fração do N contido nas plantas (*D. wilsonii* e *U. decumbens*, se aplicável) com o N total adicionado: a dose de 1,5 mM correspondeu a um cumulativo de 67,24 mg de N; a de 3 mM, a 210 mg de N; e a de 10 mM, a 700 mg de N. A razão entre o N na biomassa e o total adicionado chamou-se Eficiência no Uso do N (EUN), que foi calculada como descrito no Cap. 2. Esta comparação foi feita para o N contido na biomassa de *D. wilsonii* (Fig. 1 a e b) e também para o N contido na biomassa das duas espécies (*D. wilsonii* + *U. decumbens*) nos tratamentos pertinentes (Fig. 1 c e d). Uma vez que não houve interação entre a dose de amônio e os tratamentos ($F = 1,8$ e $p = 0,119$ para *D. wilsonii*; $F = 2,6$ e $p = 0,079$ para *D. wilsonii* + *U. decumbens*), fez-se a comparação das doses e dos tratamentos. Assim, as plantas de *D. wilsonii* que receberam 10 mM de amônio (Cap. 2) apresentaram EUN significativamente menor do que a apresentada pelas plantas cultivadas com 1,5 (Cap. 1) e 3,0 mM (Cap.2) (Fig. 1 a). Estes resultados estão de acordo com o fato das espécies arbóreas secundárias tardias e clímax (crescimento lento), adaptadas a solos ácidos e pobres, diminuírem a EUN à medida que a disponibilidade de nutrientes aumenta (Aerts & Chapin III 2000). A comparação do efeito da dose de amônio na

EUN no conjunto das duas espécies (*D. wilsonii* + *U. decumbens*) apresentou o mesmo padrão de variação, observando-se a diminuição da EUN somente na dose mais alta de amônio, possivelmente porque foram as plantas de *D. wilsonii* quem mais contribuíram para a EUN não só nesta dose como nas demais (cerca de 60%). Ainda que a dose de 3 mM tenha o dobro da disponibilidade de N da dose de 1,5 mM, não houve diferença entre as EUN de *D. wilsonii* (Fig. 1 a) e *D. wilsonii* + *U. decumbens* (Fig. 1 c) para estas duas doses, o que pode estar relacionado às diferenças nas condições e duração dos experimentos e/ou à possibilidade de que o N seja igualmente limitante nestas duas doses. Já a comparação entre os tratamentos demonstra que *D. wilsonii* apresentou maior EUN apenas quando cresceu na presença dos simbiontes (Fig. 1 b), o que poderia explicar o fato de terem sido as plantas dos tratamentos Simb as que mais cresceram nas doses 1,5 (Cap. 1) e 3 mM (Cap. 2) e ressalta o papel dos simbiontes no aumento da aquisição de N em condições limitantes (Aerts & Chapin III 2000). No entanto, a presença de *U. decumbens* fez com que a EUN de *D. wilsonii* diminuísse significativamente, contribuindo apenas entre 20 a 30% para a EUN do conjunto das duas espécies (*D. wilsonii* + *U. decumbens*), o que estaria relacionado com a competição exercida por esta Poaceae (Cap. 2). É interessante notar que em termos da capacidade de retenção do N disponível, a coexistência de *D. wilsonii* com os simbiontes e/ou com *U. decumbens* resulta numa maior EUN quando comparado com os tratamentos em que a planta está ‘sozinha’ (Fig. 1 d), o que poderia estar relacionado com a dependência de *D. wilsonii* pelos simbiontes para a aquisição do N em condições limitantes e a complementaridade de nichos entre as duas espécies de plantas que levaria a uma utilização mais eficiente do N (Kahmen *et al.* 2006), como foi observado nas plantas de Simb + Ud cultivadas com 3 mM de amônio (Cap. 2). Ainda que a presença de *U. decumbens*, em condições controladas e com herbivoria simulada, possa parecer benéfica no que se refere à conservação do N é importante

ressaltar que esta Poaceae competiu com *D. wilsonii* pelos nutrientes (Cap. 2), o que certamente seria agravado em condições de campo.

Cabe ressaltar que a limitação em N [N/P < 14 – Güsewell (2004)] verificada nas plantas que receberam as doses de 3 e 10 mM de amônio (Cap. 2) sugere que o N inorgânico pode não ser a fonte de N preferencial de *D. wilsonii*. Assumindo que esta espécie ocorre num ambiente florestal (transição entre o cerrado e a mata semidecídua) e que a ciclagem interna do N pode fazer com que a disponibilidade do N orgânico exceda à do amônio (Eviner & Chapin III 1997), a preferência de *D. wilsonii* por uma fonte orgânica de N não pode ser ignorada e, neste sentido, a identificação da ocorrência de associação simbiótica entre *D. wilsonii* e ECM (Scotti *et al.* 2009), fungos reconhecidos por favorecerem a absorção de N orgânico em espécies arbóreas (Chalot & Brun 1998), reforça esta hipótese.

Aspectos relevantes

- *D. wilsonii* pode ter o amônio como fonte preferencial de N inorgânico.
- Maior disponibilidade de N sob a forma de amônio diminui a EUN nesta espécie.
- Em condições limitantes de N inorgânico a EUN desta espécie é favorecida pela presença dos simbioss. Ressalta-se que a presença destes simbioss podem ainda atenuar o efeito negativo da competição pelos nutrientes exercida por *U. decumbens*.
- Levantou-se a possibilidade do N orgânico ser importante na nutrição de *D. wilsonii*.

Recomendações

- Em relação ao cultivo desta espécie, sugere-se que a adubação seja feita com N-amônio em concentração baixa a moderada. A fim de diminuir as perdas do N durante

e depois da nitrificação, sugere-se o uso de fertilizantes comerciais de liberação lenta (Subbarao *et al.* 2012).

- Realização de estudos que investiguem a preferência desta espécie por N orgânico e as interações bióticas relacionadas a esta preferência.

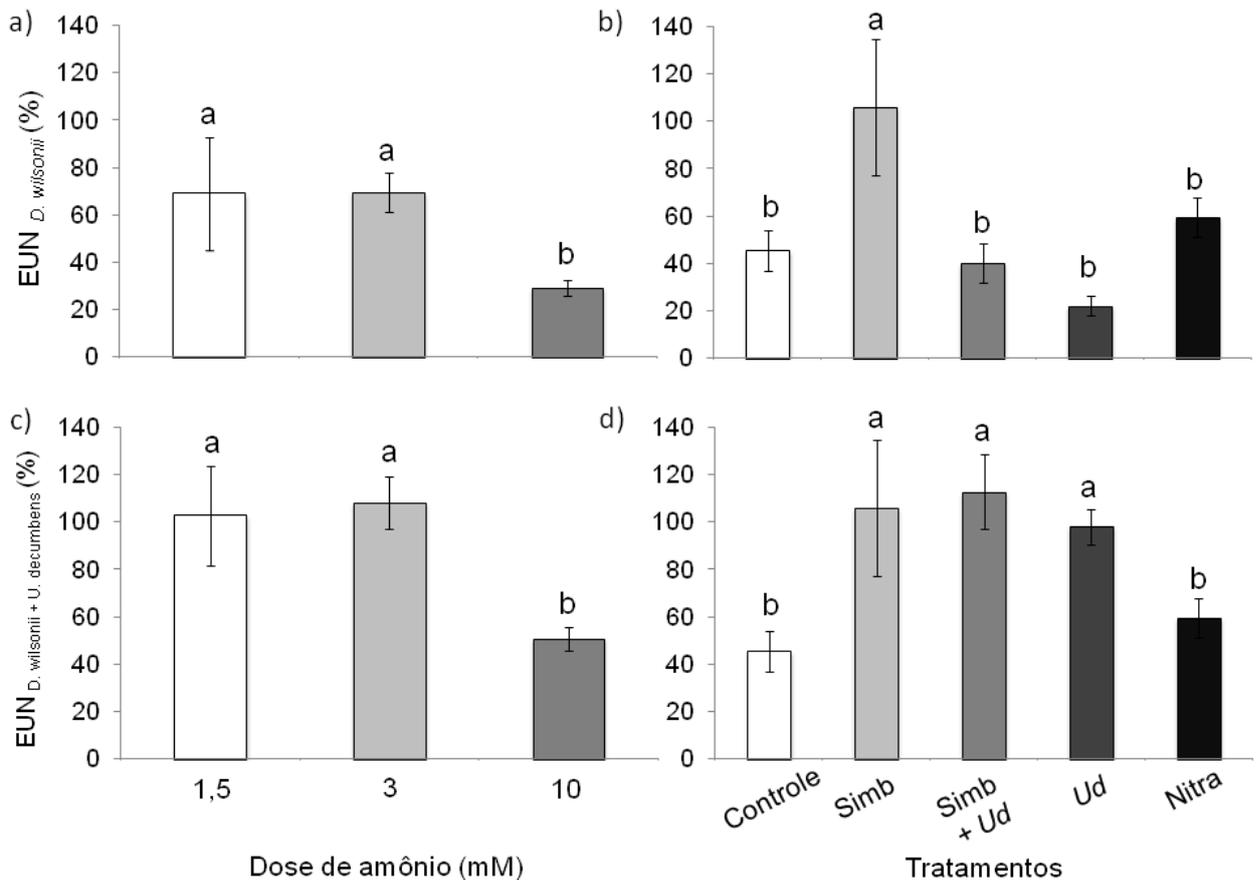


Figura 1 – Efeito da dose de amônio (1,5; 3 e 10 mM – ‘a’ e ‘c’) e dos tratamentos (Controle, Simb, Simb + Ud, Ud e Nitra – ‘b’ e ‘c’) na fração do N total adicionado ao longo dos experimentos (67,2; 210 e 700 mg de N) que estava contido na biomassa de *D. wilsonii* (‘a’ e ‘b’) e também em *U. decumbens* (nos tratamentos aplicáveis – ‘c’ e ‘d’) – EUN. Não foi verificada interações significativas entre dose e tratamento, assim letras distintas correspondem a diferenças significativas entre fatores (two-way ANOVA seguida pelo teste de Scheffé $p < 0.05$). As barras representam a média ($n = 15$ para as doses de 3 e 10 mM e $n = 12$ para a dose de 1,5 mM de amônio, devido a ausência do tratamento Nitra; $n = 6$ para o tratamento Nitra e $n = 9$ para os demais) \pm erro padrão.

CONCLUSÕES

Os dados sugerem que *D. wilsonii* pode ter o amônio como fonte preferencial de N inorgânico e, ainda, que o N orgânico pode ser importante na nutrição desta espécie. Por outro lado, no ambiente degradado em que esta espécie se encontra atualmente, a relação simbiótica com *Bradyrhizobium* sp. e *G. etunicatum* pode beneficiá-la no aporte de N e P e minimizar os efeitos negativos impostos pela competição por nutrientes quando esta espécie coexiste com *U. decumbens*. Ressalta-se que a presença da Poaceae africana pode inibir o crescimento de *D. wilsonii* e prejudicar a sua regeneração por plântula ao inibir o crescimento da bactéria fixadora de N₂ e/ou competir pelos nutrientes disponíveis.

As informações obtidas neste trabalho poderão contribuir para a conservação do germoplasma de *D. wilsonii*, espécie criticamente ameaçada de extinção, tanto *in situ* quanto *ex situ*.

REFERÊNCIAS

- AERTS, R; CHAPIN III, FS (2000) The mineral nutrition of wild plants revisited: A re-evaluation of processes and patterns. *Advances in Ecological Research* 30:1-67.
- AIDAR, MPM; SCHMIDT, S; MOSS, G; STEWART, GR; JOLY, CA (2003) Nitrogen use strategies of neotropical rainforest trees in threatened atlantic forest. *Plant, Cell and Environment* 26:389-399.
- AIDAR, MPM; CARRENHO, R; JOLY, CA (2004) Aspects of arbuscular mycorrhizal fungi in na atlantic forest chronosequence Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR), SP. *Biota Neotropica* 4(2):3-15.

CHALOT, M; BRUN, A (1998) Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. FEMS Microbiology Reviews 22:21-44.

DUBOC, E; GUERRINI, IA (2007) Crescimento inicial e sobrevivência de espécies florestais de matas de galeria no domínio do cerrado em resposta à fertilização. Energ. Agric. 22(1): 42-60.

EVINER, VT; CHAPIN III, FS (1997) Plant-microbial interaction. Nature 385:26-27.

FONSECA, MB; PEIX, A; FARIA, SM; MATEOS, PF; RIVERA, LP; SIMÕES-ARAÚJO, JL; FRANÇA, MGC; ISAIAS, RMS; CRUZ, C; VELÁZQUEZ, E; SCOTTI, MR; SPRENT, JI; JAMES, EK (2012) Nodulation in *Dimorphandra wilsonii* Rizz. (Caesalpinioideae), a threatened species native to the Brazilian Cerrado. PLOS One 7(11):e49520.

FONSECA, MB; FRANÇA, MGC; ZONTA, E; GIORNI, V (2010a) Crescimento inicial de *Dimorphandra wilsonii* (Fabaceae - Caesalpinioideae) em diferentes condições de fertilidade em solo de cerrado. Acta Botanica Brasilica 24(2):322-327.

FONSECA, MB; SIMÕES, JL; ISAIÁS, RMS; FRANÇA, MG; SCOTTI, MR; JAMES, EK; SPRENT J (2010b) Rhizobial and arbuscular mycorrhizal fungal symbioses in *Dimorphandra wilsonii*, a threatened Caesalpinioideae legume native to Brazilian Cerrado. In: Book Contributions of XIII National Meeting of the Spanish Society of Nitrogen Fixation and II Portuguese-Spanish Congress on Nitrogen Fixation. Zaragoza (Spain). p. 127-128.

FRANCO, AC (2002) Ecophysiology of woody plants. In: The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna (eds P. S. Oliveira & R. J. Marquis), Columbia University Press, New York. p. 178-197.

GOEDERT, WJ (1983) Management of the cerrado soils of Brazil: a review. Journal of Soil Science 34: 405-428.

GÜSEWELL, S (2004) N : P ratios in terrestrial plants: variation and functional significance. *New Phytologist* 164:243-266.

HOFFMANN, WA; HARIDASAN, M (2008) The invasive grass, *Melinis minutiflora*, inhibits tree regeneration in a Neotropical savanna. *Austral Ecology* 33:29-36.

IUCN (2006) IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>.

JIA, Y; GRAY, VM; STRAKER, CJ (2004) The influence of *Rhizobium* and arbuscular mycorrhizal fungi on nitrogen and phosphorus accumulation by *Vicia faba*. *Annals of Botany* 94:251-258.

KAHMEN, A; RENKER, C; UNSICKER, SB; BUCHMANN (2006) Niche complementarity for nitrogen: an explanation for the biodiversity and ecosystem functioning relationship? *Ecology* 87(5):1244-1255.

KLINK, CA; MACHADO, RB (2005) A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade* 1(1):147-155.

PIRES, ACV; PEREIRA, SR; FERNANDES, GW; OKI, Y (2012) Efeito de *Brachiaria decumbens* na herbivoria e no desenvolvimento de duas leguminosas nativas de Cerrado. *Planta Daninha* 30(4):737-746.

RIBEIRO, RC; CARVALHO, MGC; LOPES, HM; ROSSIELLO, ROP; BARBIERI JUNIOR, É (2012) Allelopathic activity of the hydrolate and water decoction of *Brachiaria humidicola* (Rendle) plant parts on germination of four tropical leguminous species. *ISRN Agronomy* 2012:ID 838767.

SCOTTI, MR; KASUYA, C; CRUZ, C; BACELAR, M; GOMES, M; MIRANDA, P; PEREIRA, RA; SPRENT, JI (2009) Multiple associations involving ectomycorrhizal and endomycorrhizal fungi, nitrogen fixing bacteria and the leguminous species *Dimorphandra wilsonii*, a threatened species from the Brazilian Cerrado. In: Book of Abstracts III International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2009). Lisbon (Portugal). p. 220.

SOUZA, AS; VENTURIN, N; MACEDO, RLG (2006) Adubação mineral do ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*). *Ciência Florestal* 16(3):261-270.

SOUZA LS; VELINE ED; MARTINS D; ROSOLEM CA (2006) Efeito alelopático do capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) sobre o crescimento inicial de sete espécies de plantas cultivadas. *Planta Daninha* 24(4):657-668.

SPRENT JI; JAMES EK (2007) Where do nodules and mycorrhizas fit in? *Plant Physiology* 144:575-581.

STEWART, GR; JOLY, CA; SMIRNOFF, N (1992) Partitioning of inorganic nitrogen assimilation between the roots and shoots of cerradão and forest trees of contrasting plant communities of south east Brazil. *Oecologia* 91:511-517.

SUBBARAO, GV; SAHRAWAT, KL; NAKAHARA, K; ISHIKAWA, T; KISHII, M; RAO, IM; HASH, CT; GEORGE, TS; RAO PS; NARDI, P; BONNETT, D; BERRY, W; SUENAGA, K; LATA, JC (2012) Biological nitrification inhibition – A novel strategy to regulate nitrification in agricultural systems. *Advances in Agronomy* 114: 249-306.

VITOUSEK, PM, GOSZ, JR; GRIER, CC; MELILLO, JM; REINERS, WA (1982) A comparative analysis of potencial nitrification and nitrate mobility in forest ecosystems. *Ecological Monographs* 52(2):155-177.