**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**MINHOCAS, FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM MUDAS DE *Araucaria angustifolia***

Priscila Trigo Martins Azevedo

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Ciências. Área de
concentração: Solos e Nutrição de Plantas

**Piracicaba
2010**

Priscila Trigo Martins Azevedo
Engenheiro Agrônomo

**Minhocas, fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas em mudas
de *Araucaria angustifolia***

Orientadora:
Prof.^a Dra. ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA
CARDOSO

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Ciências. Área de
concentração: Solos e Nutrição de Plantas

**Piracicaba
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Azevedo, Priscila Trigo Martins

Minhocas, fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas em mudas de
Araucaria angustifolia / Priscila Trigo Martins Azevedo. - - Piracicaba, 2010.
76 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Fixação de nitrogênio 2. Florestas 3. Fungos micorrízicos 4. Oligochaeta 5. Pinheiro (6)
Rizosfera I. Título

CDD 634.9751
A994m

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A minha família, Mateus e Gabriela, aos meus pais, irmãos e aos apaixonados pela biologia do solo,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por cada momento de aprendizado.

Agradeço a minha orientadora Elke Cardoso pela compreensão, pelos ensinamentos, conselhos e paciência durante a condução deste trabalho.

Agradeço aos “co-orientadores das minhocas”, Dilmar Baretta e George Brown, pelas idéias e disposição em me socorrer sempre que precisei. Especialmente ao Dilmar, MUITO OBRIGADA por sua ajuda nos meses finais de 2008.

Agradeço a minha amiga Sara Hirata, sempre solícita e querida, pelo auxílio na execução do experimento.

Agradeço a Denise e ao Fernando pela disposição em me ensinar e ajudar em todos os momentos e por tantas conversas agradáveis.

Agradeço a minha amiga e cunhada Simone pelo incentivo e companheirismo. Agradeço a Julia pelas dicas do trabalho e amizade. Agradeço a companhia dos ótimos colegas de disciplina Carlão, Mylenne, Marina, Bolinha e Jamil.

A todos os colegas do laboratório: Alessandra, Alexandre, Aline Figueiredo, Aline Passos, Aninha, André, Carlão, Daniel Bini, Daniel Lammel, Fabio, Fabrício, Henrique, Jamil, Joice, Julia, Marina, Mylenne, Paulo, Pilar, Plínio, Rafael Bolinha, Rafael Vasconcellos, Sara, Simone e Thiago, agradeço as conversas, sugestões, críticas, muitas risadas e auxílio na instalação do experimento e nas avaliações finais.

Ao Mateus, meu esposo, agradeço pelo incentivo constante, pela ajuda em todos os aspectos da minha vida, pela ótima companhia e por seu amor.

A Gabriela, obrigada por seu sorriso e abraço no começo e fim do dia. Foi motivador! Os choros à noite, nem tanto...

Agradeço aos meus pais, Gilberto e Iracema, pelo amor e apoio incondicionais, imprescindíveis para eu chegar até aqui.

A toda minha família, avós, irmãos, sogros, cunhados, tios, primos (os Trigo, os Martins, os Carvalho e os Azevedo) agradeço pelos exemplos de vida e ajuda. Especialmente a Iracema, Marlene, Malu e Ana Julia, e ao Mateus, Benny e Erasmo, agradeço o auxílio com a Gabriela nas últimas semanas. À “vó Iracema”, obrigada pelos almoços todos os fins de semana.

A CAPES, agradeço pelo apoio financeiro.

Agradeço a ajuda de todos, sem a qual não seria possível realizar este trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1 Introdução.....	13
2 Revisão bibliográfica.....	15
2.1 <i>Araucaria angustifolia</i>	15
2.2 Efeito das minhocas nos vegetais.....	17
2.3 Efeito dos fungos micorrízicos arbusculares nos vegetais.....	21
2.4 Efeito das bactérias diazotróficas nos vegetais.....	23
2.5 Interação entre FMA e diazotróficos.....	24
2.6 Interação entre minhocas e FMA.....	27
2.7 Interação entre minhocas e diazotróficos.....	29
3 Materiais e métodos.....	31
4 Resultados e Discussão.....	37
4.1 Colonização e esporulação do FMA.....	37
4.2 Altura e diâmetro das plantas.....	41
4.3 Biomassa das plantas.....	42
4.4 Estado nutricional das plantas.....	45
4.5 Sobrevivência, reprodução e massa fresca de minhocas.....	49
4.6 Análise de Componentes Principais.....	50
5 CONCLUSÕES.....	53
Referências.....	54
Anexos.....	73

RESUMO

Minhocas, fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas em mudas de *Araucaria angustifolia*

A *Araucaria angustifolia* possui alto valor madeireiro e resinífero, é fonte de alimento e espécie característica da Floresta Ombrófila Mista, um ecossistema rico em espécies endêmicas e detentor de alta diversidade. Devido à intensa exploração durante décadas, atualmente a araucária é considerada espécie em perigo crítico de extinção, sendo fundamental a compreensão deste ecossistema para sua preservação e regeneração. As minhocas, os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e as bactérias diazotróficas são organismos edáficos que desempenham funções essenciais no processo de ciclagem de nutrientes e podem favorecer o desenvolvimento vegetal. Muitos trabalhos avaliam o efeito de cada um destes organismos separadamente, mas o estudo das interações entre eles é escasso. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da inoculação de minhocas invasoras *Amyntas corticis*, do FMA *Gigaspora rosea* e de um isolado de bactéria diazotrófica sobre o desenvolvimento de mudas de araucária, considerando suas interações. O experimento foi realizado em vasos, em casa de vegetação, sob delineamento em blocos casualizados, em esquema fatorial 2x2x2, sendo: presença e ausência de minhoca (*A. corticis*), presença e ausência de FMA (*G. rosea*), e presença e ausência de bactéria diazotrófica (isolado S32274), com oito repetições cada, sendo que a metade dos vasos foi avaliada 150 dias após o transplântio (Época 1) e o restante aos 250 dias após o transplântio (Época 2) das mudas de araucária. Os parâmetros de avaliação foram: altura e diâmetro das plantas, massa seca das raízes e da parte aérea, concentração e conteúdo total de nitrogênio e fósforo da parte aérea, densidade de esporos de *G. rosea* no substrato, taxa de colonização radicular pelo FMA e sobrevivência, reprodução e massa fresca das minhocas. A biomassa e o conteúdo de N e P das plantas foram afetados pela interação dos organismos. A inoculação de *G. rosea* propiciou melhor desenvolvimento das mudas de araucária, entretanto, não houve efeito significativo da inoculação de somente diazotróficos. As plantas inoculadas com minhocas apresentaram tendência de menor biomassa e a sobrevivência das minhocas foi baixa. O estudo das interações de microrganismos e macrofauna deve ser considerado na pesquisa e desenvolvimento de práticas de manejo mais sustentáveis para reflorestamento e manutenção de florestas de araucária.

Palavras chave: Oligochaeta, *Amyntas corticis*, *Gigaspora rosea*, fixação biológica de nitrogênio, pinheiro do Paraná

ABSTRACT

Interactions between invasive earthworms, arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria and native araucaria pine seedling performance

Araucaria angustifolia is a tree of high lumber and resin values, a source of food, and the most important tree in the Mixed Subtropical Ombrophilous forest, a rich ecosystem with many endemic species. However, due to intense exploration for decades, the Araucaria is presently considered a critically endangered species, and the understanding of this ecosystem is fundamental for conservation and regeneration purposes. Soil organisms such as earthworms, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and diazotrophic bacteria play an essential role in nutrient cycling and can increase plant performance. Many studies have evaluated the impact of each of these organisms independently, but few have studied their interactions. Therefore, the aim of this study was to evaluate the inoculation effects of invasive earthworms (*Amyntas corticis*), AMF (*Gigaspora rosea*) and an isolated of diazotrophic bacteria, and the interactions between each of these, on the performance of *A. angustifolia* seedlings. The plants were grown in greenhouse conditions in a block-type randomized design with a factorial layout of 2x2x2, being: presence and absence of earthworms (*A. corticis*), presence and absence of AMF (*G. rosea*) and presence and absence of diazotrophic bacteria (isolated S32274), in eight replicates, evaluated at 150 and 250 d after transplanting. The following parameters were evaluated: plant height and diameter, shoot and root biomass, shoot nutrient content (P, N), number of AMF spores, root mycorrhizal colonization rate and earthworm survival, reproduction and fresh biomass. Plant biomass and shoot nutrient content were affected by the three-way interaction of earthworms, AMF and bacteria. AMF inoculation enhanced *A. angustifolia* performance, while bacterial inoculation alone had no significant effect on plants and earthworms had low survival rates and tended to reduce plant biomass. Microbial-faunal interactions can lead to important changes in plant growth and should be considered in future research and development of sustainable Araucaria forest management practices.

Keywords: Oligochaeta, *Amyntas corticis*, *Gigaspora rosea*, biological nitrogen fixation, Brazil Pine

1 INTRODUÇÃO

A *Araucaria angustifolia* faz parte das poucas árvores gimnospermas nativas que restaram no Brasil (RIZZINI, 1997). A espécie é característica da Floresta Ombrófila Mista, também chamada de Floresta de Araucária, um ecossistema único na América do Sul (RAMBO, 2000), rico em espécies endêmicas e detentor de alta diversidade, que constitui reserva biológica importante na conservação da biodiversidade (FONSECA et al., 2009).

As Florestas de Araucária foram intensamente exploradas devido ao alto valor madeireiro e resinífero do pinheiro. Atualmente, as áreas de preservação da espécie ocupam 0,4% do total da área original da floresta (RIBEIRO et al., 2009) e a *A. angustifolia* é considerada espécie em perigo crítico de extinção (FARJON, 2006), sendo fundamental a compreensão deste ecossistema para sua preservação e regeneração.

Os organismos edáficos participam de vários processos considerados críticos para a manutenção da fertilidade e qualidade dos solos de ecossistemas agrícolas e naturais. A atividade das minhocas, por exemplo, é componente importante na ciclagem dos nutrientes, pois promove a atividade microbiana e a mineralização da matéria orgânica do solo (LEE, 1985; LAVELLE; SPAIN, 2001), além da formação de agregados estáveis e melhoria das propriedades físicas do solo, como sua capacidade de retenção de água (EDWARDS; BOHLEN, 1996; SHIPITALO; LE BAYON, 2004).

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) também atuam na estabilidade dos agregados do solo (RILLIG, 2004), mas são amplamente conhecidos por aumentar a capacidade de absorção de água e nutrientes (P, Cu, Zn) quando em restrição para as raízes (SMITH; READ, 1997) e proporcionar maior tolerância da planta à toxicidade por metais pesados (ARRIAGADA, 2010), a pragas (VANNETTE; HUNTER, 2009) e patógenos (SIKES et al., 2009).

As bactérias diazotróficas são responsáveis pela fixação biológica do nitrogênio (FBN), processo essencial para o estabelecimento da vida na Terra (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), podem produzir substâncias promotoras do crescimento vegetal

(LODEWYCKX et al., 2002) e participar do controle biológico de organismos patogênicos (LUCY et al., 2004).

Estudos anteriores investigaram a ocorrência desses grupos de organismos em Florestas de Araucária e se destacaram as espécies *Amyntas corticis*, *Gigaspora rosea* e *Novosphingobium* sp. entre as minhocas, os FMA e as bactérias diazotróficas, respectivamente (BARETTA et al., 2007; SOUZA, 2000; NERONI; CARDOSO, 2007). Para dar continuidade ao estudo destes organismos, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da inoculação de minhocas *A. corticis*, do FMA *G. rosea* e de um isolado da bactéria diazotrófica sobre o desenvolvimento de mudas de araucária, considerando suas interações.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Araucaria angustifolia*

A *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, também conhecida como pinheiro-brasileiro, pinheiro-do-Paraná ou araucária, pertence à família Araucariaceae e, juntamente com algumas espécies de *Podocarpus* sp., faz parte das poucas árvores gimnospermas nativas que restaram no Brasil (RIZZINI, 1997), sendo a única do gênero no país (KERSHAW; WAGSTAFF, 2001).

Quando o pinheiro atinge a maturidade, sua copa possui formato de taça e a árvore adquire forma de candelabro, caracterizando a espécie e diferindo-a das demais árvores (SOLÓRZANO-FILHO; KRAUS, 1999). As araucárias podem atingir em média 140 a 250 anos de idade, 10 a 35 m de altura e 50 a 120 cm de diâmetro à altura do peito (DAP) (CARVALHO, 1994), mas existem relatos de árvores de até 50 metros de altura, 240 cm de DAP e com mais de 300 anos de idade (REITZ; KLEIN, 1966; BACKES; NILSON, 1983).

A espécie possui algumas características de pioneira, como a germinação das sementes em pleno sol e a alta frequência em que ocupa áreas de campo, de modo a formar continuamente novos capões (IMAGUIRE, 1979; GURGEL FILHO, 1980) mas, segundo a classificação de Budowski (1965) é considerada uma espécie secundária longeva. A araucária não se regenera no interior de florestas por causa da baixa luminosidade (BACKES, 1973), suas sementes possuem curta longevidade natural e dispersão dificultada pelo grande peso e tamanho dos pinhões, além de ser uma planta dióica, cujas flores masculinas ou femininas são polinizadas pelo vento e somente surgem aos 15 anos de idade, quando a árvore está adulta (SOARES, 1979; CARVALHO, 1994).

A Araucária é a principal representante da Floresta Ombrófila Mista, também chamada de Floresta ou Mata de Araucária, um ecossistema único na América do Sul (RAMBO, 2000), rico em espécies endêmicas e detentor de alta diversidade, cuja reserva biológica é importante na conservação da biodiversidade (MOREIRA et al., 2007a; FONSECA et al., 2009).

A Araucária forma o extrato superior da mata, fornecendo condições para outros vegetais importantes se estabelecerem, como as lauráceas (imbuia, canelas), leguminosas (jacarandá, caviúna e monjoleiro), mirtáceas (guabiroba, pitanga), a erva-mate e o pinheiro-bravo (CARVALHO, 1994). A vegetação na Floresta Ombrófila Mista não é homogênea e contínua, mas ocorrem formações vegetais com múltiplas associações e grupamentos que variam de acordo com o estágio de sucessão (KLEIN, 1960).

A Floresta de Araucária faz parte do Bioma da Mata Atlântica (Decreto Lei 750/1993) e pode ser encontrada, principalmente, nos Estados do sul do Brasil, entre 500 e 1500 m de altitude, e em áreas disjuntas e de elevada altitude (>1000m), em São Paulo, sul de Minas Gerais e sudoeste do Rio de Janeiro, além da ocorrência esparsa no nordeste da Argentina e leste do Paraguai (VEBLIN et al., 1995).

As araucárias se desenvolvem em condições subtropicais e mesotérmicas: requerem invernos não tão rigorosos, cuja temperatura média seja aproximadamente 10°C e verões chuvosos, sendo que *A. angustifolia* demanda, no mínimo, 1400 mm de precipitação pluviométrica anual (KERSHAW; WAGSTAFF, 2001). As plantas suportam temperaturas negativas (SILVA et al., 2001), mas seu crescimento é afetado em épocas de baixa precipitação pluviométrica e altas temperaturas (SILVA et al., 2009).

As Florestas de Araucária estão naturalmente distribuídas em áreas diversificadas quanto à geologia, geomorfologia e solos regionais (OLIVEIRA, 1948), ocupando solos pobres, derivados de arenitos, como nos campos gerais do Paraná e solos férteis, derivados de basalto, que ocorrem no oeste de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Embora alguns autores demonstrem a importância da profundidade do solo para a araucária atingir seu desenvolvimento potencial (SILVA et al., 2001), a espécie pode desenvolver um sistema radicular compensatório sob condições de pouco espaço vertical para o enraizamento da raiz principal, conferindo plasticidade às mudas de araucária em relação a diferentes profundidades de solo (KORNDÖRFER, 2007).

O pinheiro-do-Paraná possui alto valor madeireiro, resinífero e alimentar (pinhão). Sua exploração foi mais intensa entre as décadas de 30 e 70, e não houve preocupação com o reflorestamento da espécie (GUERRA et al., 2002). Somente uma companhia inglesa, a Lumber and Colonisation Comp. Ltda., extraiu mais de quinze

milhões de árvores de *A. angustifolia* (MEDEIROS et al., 2004) e, com o passar do tempo, a demanda da indústria por matéria prima resultou em programas de reflorestamento com espécies exóticas, especialmente os *Pinus* sp., que passaram a ocupar as áreas originalmente cobertas com araucária (GUERRA et al., 2002). Hoje, menos de 0,5% do total de áreas reflorestadas no Brasil é ocupado por araucária (VASCONCELLOS, 2007).

Atualmente, as matas primárias em maciços extensos são raras, restando matas secundárias, onde permaneceram alguns pinheiros; dos 250.000 km² originalmente ocupado por Mata de Araucária, restaram 12,6% (32.000 km²) de área com o pinheiro e, deste remanescente, 980 km² são áreas protegidas, ou seja, do total da área original com araucária, somente 0,39% são áreas de preservação permanente (RIBEIRO et al., 2009). Sendo assim, a *A. angustifolia* é espécie em perigo crítico de extinção (BRASIL, 1992; FARJON, 2006).

No Estado de São Paulo, a Floresta de Araucária ocupa 3% da área total (BARETTA, 2007), sendo a maior concentração preservada no Parque Estadual de Campos do Jordão e no Parque Estadual Turístico do Alto da Ribeira, no município de Apiaí (NERONI, 2007).

2.2 Efeito das minhocas nos vegetais

As minhocas pertencem à classe Oligochaeta, inserida no filo Annelida, e podem representar 40 a 90% da biomassa da macrofauna edáfica em ecossistemas naturais (LAVELLE et al., 1994). A abundância e biomassa médias de minhocas encontradas em Floresta de Araucária foram 8,4 indivíduos m⁻² e 12,3 gramas m⁻², respectivamente (BARETTA et al., 2007).

A atividade destes organismos é componente importante na formação e manutenção da estrutura dos solos e na ciclagem de nutrientes, pois atuam na decomposição e mineralização da matéria orgânica do solo (MOS) através da fragmentação de resíduos vegetais e animais e estimulação da atividade microbiana (LEE, 1985; LAVELLE; SPAIN, 2001); produzem coprólitos, estruturas biogênicas

estáveis e ricas em nutrientes, como o C, N e P, disponíveis para as plantas e microrganismos (BROWN et al., 2000a; CHAOUI et al., 2003; BARETTA et al., 2009); se movimentam dentro e entre as camadas de solo, resultando na distribuição de partículas minerais e MOS pelo perfil, aumento de agregados estáveis, da proporção de macroporos e da capacidade de retenção de água do solo (EDWARDS; BOHLEN, 1996; BLANCHART et al., 1999; SHIPITALO; LE BAYON, 2004).

A percepção de que as minhocas influenciavam positivamente a fertilidade dos solos já existia na época do Império Egípcio e dos grandes filósofos, como Aristóteles, e foi amplamente descrita por Darwin, em 1881. O primeiro trabalho que relata o efeito das minhocas no crescimento de plantas também data do final do século XIX e, até o presente, foram publicados mais de 120 artigos científicos sobre o assunto, sendo a grande maioria com minhocas de clima temperado ou predominante na Europa (ex: Lumbricidae) e espécies vegetais de interesse agrícola, como cereais e forrageiras (SCHEU, 2003; BROWN et al., 2004).

Em geral, o efeito das minhocas no crescimento das plantas é positivo (JAMES; SEASTEDT, 1986; HAIMI et al., 1992; SCHEU; PARKINSON, 1994; TUFFEN et al., 2002; WURST et al., 2004; ZAREA et al., 2009). Brown et al. (1999) avaliaram vinte e oito experimentos envolvendo minhocas e plantas tropicais e, em 75% dos casos, as minhocas aumentaram a biomassa das plantas, principalmente de espécies perenes. Resultado semelhante foi descrito por Scheu (2003), que revisou sessenta e sete estudos cujos objetivos eram relacionar a presença de minhoca e o desenvolvimento de plantas e, em 79% dos trabalhos, a inoculação de minhocas aumentou a biomassa das plantas.

Stephens e Davoren (1996) relataram que *Aporrectodea trapezoides* e *A. rosea* favoreceram o crescimento de raízes de trigo e a concentração de nutrientes na parte aérea destas plantas. Van Rhee (1977) também encontrou aumento na densidade de raízes finas de macieiras quando *A. caliginosa* e *Lumbricus terrestris* foram inoculadas, o que resultou numa produtividade média de maçãs 2,5% maior. O teor de nitrogênio total, a ramificação e o enraizamento de mudas de duas espécies florestais, *Betula pendula* e *Fagus sylvatica*, também foram maiores na presença das minhocas *A.*

tuberculata e *Octolasion lacteum*, respectivamente (WOLTERS; STICKAN, 1991; HAIMI; ENBROK, 1992).

Os mecanismos responsáveis pela resposta positiva das plantas, na presença de minhocas, podem ser indiretos, como (1) a alteração das propriedades físicas e químicas do solo que promove maior disponibilidade de nutrientes e melhor aproveitamento de água e oxigênio para as plantas (DOUBE et al., 1997) e (2) a dispersão (REDDEL; SPAIN, 1991) e estimulação de microrganismos benéficos que produzem substâncias promotoras e reguladoras do crescimento de plantas (EISENHAUER et al., 2007) e podem formar associações simbióticas com as plantas (MA et al., 2006); ou os mecanismos podem ser diretos, que incluem (1) a produção e secreção das substâncias promotoras do crescimento de plantas pelas minhocas (EL HARTI et al., 2001), (2) o biocontrole de pragas, parasitas e patógenos (CHAOUI et al., 2002) e (3) a maior dispersão e germinação de sementes (BROWN et al., 2004).

Em algumas ocasiões as minhocas podem afetar negativamente o desenvolvimento vegetal, através da dispersão de microrganismos patogênicos (HAMPSON; COOMBS, 1989), de danos físicos às raízes finas e hifas de FMA e impedimento do crescimento dos mesmos (BROWN et al., 2004), e do consumo seletivo de micélio e esporos de FMA (BONKOWSKI et al., 2000), o que pode levar à diminuição da colonização micorrízica. O papel das raízes e rizodeposição na dieta das minhocas é pouco conhecido (BROWN et al., 2004) e, embora algumas espécies da família Lumbricidae possam se alimentar de raízes vivas (GUNN; CHERRET, 1993), este não é um hábito comum entre as minhocas, principalmente entre as nativas tropicais (BROWN et al., 1999; BARTZ et al., 2009).

A espécie de minhoca mais encontrada na Floresta de Araucária em Campos do Jordão é *Amyntas corticis* (Kinberg, 1867) (BARETTA et al., 2007). Esta espécie pertence à família Megascolecidae, provavelmente é originária da Ásia e está muito bem distribuída por todo o Brasil (BROWN et al., 2006), sendo encontrada, inclusive, em matas secundárias e em áreas bem preservadas da Mata Atlântica (TANCK et al., 2000). Constitui, portanto, uma espécie exótica, migradora e invasiva, com capacidade de colonizar áreas novas e se tornar a espécie dominante, causando mudanças no solo e, conseqüentemente, nas populações de outros organismos edáficos e plantas

(BROWN et al., 2006). No nordeste dos EUA, *Amyntas* spp. invadiram florestas nativas e causaram pedoturbação (BURTELOW et al., 1998).

De acordo com seu comportamento, alguns autores consideram *A. corticis* uma espécie epigêica por estar mais próxima à superfície do solo (GARCIA; FRAGOSO, 2002; 2003), mas de acordo com a classificação ecológica de Bouché (1977), esta espécie pode ser considerada epi-endogêica poli-húmica, pois está mais próxima à superfície, forma galerias verticais e horizontais e se alimenta de muita matéria orgânica. Produzem coprólitos pequenos, apresentam um ciclo de vida curto e, praticamente, se reproduzem por partenogenia, fatores que promovem a rápida colonização de novas áreas por estas espécies (BROWN et al., 2006).

Callaham e Hendrix (1998) relatam que a maior abundância de *Diplocardia mississippiensis*, também pertencente à Megascolecidae, favoreceu o desenvolvimento das plantas e a concentração de nitrogênio (N) nos tecidos vegetais de *Aristida stricta* (poácea) e em mudas de *Pinus palustris*, sendo que o maior ganho de biomassa foi na planta herbácea, sugerindo que esta espécie de minhoca tenha uma interação mais específica com *A. stricta*.

Os poucos trabalhos que avaliaram o efeito de *Amyntas* spp. na produção vegetal obtiveram resultados distintos (1) efeito positivo para plantas de cultivo anual, como o trigo e a soja (BROWN et al., 2006), e para a espécie florestal *Mimosa scabrella*, popularmente conhecida como bracatinga (KOBIYAMA et al., 1995); (2) efeito negativo para o feijoeiro (KUSDRA, 1998); e (3) não observaram efeito significativo da minhoca na produção de aveia preta e feijão (SANTOS, 1995).

2.3 Efeito dos Fungos Micorrízicos Arbusculares nos vegetais

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) pertencem ao filo Glomeromycota, são asseptados, biotróficos obrigatórios e colonizam inter e intracelularmente o córtex de raízes de mais de 80% das espécies vegetais, formando uma associação simbiótica importante e bastante comum na natureza (SMITH; READ, 1997; SCHÜßLER et al., 2001).

As estruturas típicas formadas pelos FMA são os arbúsculos, originados da diferenciação das hifas no interior das células radiculares, são estruturas efêmeras, muito ramificadas e constituem os sítios de troca da simbiose (BONFANTE-FASOLO, 1984). Algumas espécies da família Glomeraceae também podem formar vesículas, estruturas ricas em lipídeos cuja função é de reserva (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Estas estruturas específicas dos FMA podem ser visualizadas através da clarificação e coloração das raízes por processo químico e, após observação microscópica, servem para identificar e quantificar a colonização radicular. Na associação micorrízica arbuscular (MA) estas estruturas não podem ser detectadas a olho nu, ao contrário do que acontece nas ectomicorrizas (PHILLIPS; HAYMAN, 1970)

Embora os mecanismos que regulam as MA não estejam completamente elucidados (KIRIACHEK et al., 2009), sugere-se que moléculas sinalizadoras exsudadas pelas raízes de plantas hospedeiras são efetivamente reconhecidas pelos FMA e estimulam seus propágulos e germinação (BUÉE et al., 2000; TAMASLOUKHT et al., 2003). Estas moléculas sinais podem ser flavonóides (BAPTISTA; SIQUEIRA, 1994; AKIYAMA et al., 2002) e/ou estrigolactonas (AKIYAMA et al., 2005) e desencadeariam o processo de micorrização.

A concentração de fósforo (P) disponível no solo também tem grande efeito no desenvolvimento da simbiose, já que baixa concentração de P na planta promove o desenvolvimento pleno da simbiose, enquanto que alta concentração deste elemento parece restringir seu desenvolvimento (SMITH; READ, 1997). Moreira e Siqueira (2006) fornecem algumas hipóteses para explicação deste fenômeno: (a) as condições de deficiência de P aumentam a atividade de fosfatases nas raízes e conseqüentemente, a inativação de lectinas, as quais inibiriam o crescimento do fungo no córtex; (b) a

quantidade de exsudatos promotores de germinação e crescimento micelial na rizosfera depende da permeabilidade da membrana celular da raiz, que pode ser afetada pela absorção de P (GRAHAM et al., 1981); (c) a maior disponibilidade de P no solo acarreta aumento na fotossíntese e translocação de maior quantidade de sacarose até as raízes, tornando-se inibitória para o crescimento fúngico (SIQUEIRA, 1983); (d) o P atua indiretamente em mecanismos bioquímicos, modulando a supressão ou indução gênica do processo de micorrização (LAMBAIS; MEDHY, 1993).

A micorriza arbuscular é uma associação mutualista: o fungo cresce nos tecidos vegetais vivos e obtém fotossintatos da planta hospedeira (SMITH; READ, 1997), a qual é beneficiada pelas melhorias nutricionais causadas pelo FMA, especialmente em relação aos elementos de baixa mobilidade que se encontram fora do alcance da raiz, como o P (CARDOSO, 1985; NOGUEIRA; CARDOSO, 2006; IPSILANTIS, 2009), Zn (PACOVSKY et al., 1986; ANDRADE et al., 2009) e Cu (PACOVSKY, 1986; SOARES; SIQUEIRA, 2008). Isto ocorre porque o micélio extrarradical do FMA explora um volume maior de solo que as raízes, aumentando a capacidade de absorção do sistema radicular.

O FMA também pode absorver nitrogênio e transferi-lo para as plantas (HODGE et al., 2001), favorecer a relação água-planta (SYLVIA; WILLIAMS, 1992), aumentar a tolerância das plantas à toxicidade por metais pesados como o Fe e Al (VOGT et al., 1987), Zn (ARRIAGADA, 2010) e Mn (NOGUEIRA et al., 2007), aumentar a proteção da planta contra pragas (VANNETTE; HUNTER, 2009) e patógenos (SIKES et al., 2009) e contribuir para a formação de agregados estáveis do solo (RILLIG, 2004; CHO et al., 2009). Em troca, a planta fornece fotossintatos para o FMA, em quantidades que podem variar de 4% a 23% do produto total da fotossíntese (MORTIMER et al., 2008; KASCHUK et al., 2010) ou até 39% dos compostos fotossintéticos (PENG et al., 1993).

Araucaria angustifolia é uma planta micotrófica (MOREIRA-SOUZA; CARDOSO, 2002) e nas suas florestas predominam os gêneros de FMA *Acaulospora* e *Glomus* (BONONI et al., 1989; BREUNINGER et al., 2000; MOREIRA-SOUZA et al., 2003; MOREIRA et al., 2009). Experimentos em casa de vegetação mostraram que a inoculação de esporos de *Gigaspora rosea* proporcionou maior colonização radicular e melhor desenvolvimento de mudas do pinheiro em comparação com outras espécies de

FMA (SOUZA, 2000). Machineski et al. (2009) também encontraram maior crescimento de peroba rosa (*Aspidosperma polyneuron* M. Arg) inoculada com *Gigaspora margarita*.

2.4 Efeito das bactérias diazotróficas nos vegetais

A fixação biológica de nitrogênio (FBN), processo no qual o nitrogênio atmosférico (N_2) é reduzido para a forma combinada amônia (NH_3), disponível para plantas e microrganismos, é responsável por cerca de 65% do total de nitrogênio (N) fixado no planeta. Os microrganismos fixadores de N_2 ou diazotróficos representam uma parcela pequena dos procariotos, porém apresentam alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A maioria das espécies diazotróficas é de vida livre, mas podem formar simbiose com fungos e várias espécies vegetais ou estabelecer associações menos especializadas com plantas (ADAMS et al., 2006). Os microrganismos fixadores de N ocorrem em todos os tipos de solo, na rizosfera e filosfera de plantas, em águas doces e salgadas, no trato intestinal de alguns animais e podem colonizar tecidos internos vegetais, tornando-se endofíticos facultativos ou obrigatórios (BALDANI et al, 1997). Em geral, as bactérias endofíticas contribuem mais para o desenvolvimento da planta que as associativas (BALDANI; BALDANI, 2005).

Entre as associações simbióticas mais estudadas e que, comprovadamente, aumentam o desenvolvimento vegetal, estão a de *Nostoc/Anabaena* com *Azolla*, uma pteridófita aquática cultivada como adubo verde; a de *Gluconoacetobacter diazotrophicus* com cana-de-açúcar; e as de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). No entanto, a simbiose rizóbio-soja é a que mais se destaca no Brasil, por ser muito eficiente e ter importância econômica e ecológica ao dispensar totalmente a adubação nitrogenada sem causar perda de produtividade (HUNGRIA et al., 2001).

Ao realizar a FBN, as bactérias diazotróficas da rizosfera são promotoras do crescimento de plantas (PCP), mas também podem atuar na promoção do desenvolvimento do hospedeiro através de outros mecanismos diretos como a síntese

de fitormônios (auxinas, giberelinas e citocininas), sideróforos, ácidos solubilizadores de fosfatos e moléculas que podem modular o crescimento da planta (BAZZICALUPO; OKON, 2000; LODEWYCKX, 2002), ou mecanismos indiretos como a produção de antibióticos contra bactérias patogênicas e enzimas inibidoras de fungos patogênicos, a diminuição de ferro disponível para fitopatógenos e a competição com microrganismos prejudiciais na rizosfera (LUCY et al., 2004).

Neroni e Cardoso (2007) relataram pela primeira vez a ocorrência de bactérias diazotróficas em araucária e obtiveram 73 isolados potencialmente diazotróficos de raízes e solo rizosférico da araucária, sendo que quatro isolados (*Burkholderia* sp., *Pseudomonas* sp., *Brucella* sp. e *Novosphingobium* sp.) mostraram alta atividade da nitrogenase. O isolado S32274, pertencente ao gênero *Novosphingobium* spp., propiciou melhor desenvolvimento de mudas de araucária em experimento realizado em casa de vegetação (LIMA et al., 2009).

2.5 Interação entre FMA e diazotróficos

As interações entre FMA e bactérias diazotróficas ocorrem na micorrizosfera, região do solo intimamente ligada às raízes e hifas fúngicas (RAMBELLI, 1973). Estes organismos podem interagir em cooperação e estimular o crescimento vegetal (SECILIA; BAGYARAJ, 1987; CLARK et al., 1999; BIRÓ et al., 2000; BHOWMIK; SINGH, 2004; BAREA et al., 2005) através de diversos mecanismos, incluindo o aumento na disponibilidade de nutrientes para as plantas e inibição de fitopatógenos na rizosfera (ARTURSSON et al., 2006).

A sinergia entre rizóbio e FMA em leguminosas está bem documentada. Cardoso (1986) avaliou a eficiência de diferentes FMA na simbiose soja-rizóbio, em três tipos de solo, esterilizados e não esterilizados, e obteve aumentos significativos na matéria seca da parte aérea e das vagens, no peso dos nódulos secos, na concentração de fósforo e nas quantidades totais da maioria dos outros nutrientes vegetais quando os solos arenosos, esterilizados e naturais, e o solo argiloso esterilizado foram inoculados com determinadas espécies de FMA. Em outra publicação, a mesma autora cita diversos

trabalhos que mostram o efeito positivo dos FMA na produção, nodulação e concentração de nutrientes (N, P, K, Ca, Fe, Cu, Zn) da matéria seca de leguminosas, porém relata não existir evidências de uma interação direta entre *Rhizobium* spp. e os FMA (CARDOSO, 1985).

Autores que avaliaram espécies florestais também relataram resposta positiva das plantas inoculadas com FMA e *Rhizobium* spp. Burity et al. (1999) observaram maior nodulação, aumento da colonização micorrízica e redução da esporulação de FMA na espécie florestal sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia*) quando inoculada com dois gêneros de FMA (*Glomus* sp. e *Acaulospora* sp.) e *Rhizobium* sp. Na avaliação de cinco espécies florestais (*Acacia mangium*, *Inga edulis*, *M. caesalpiniaefolia*, *Parkia multijuga* e *Schinus terebinthifolia*) para recuperação de áreas degradadas pela mineração, a adição de composto orgânico e a inoculação de FMA (*Glomus clarum*, *Glomus intraradices* e *Gigaspora rosea*) e *Rhizobium* spp. proporcionaram maior biomassa e conteúdo de N e P das plantas (MENDES FILHO et al., 2009)

A enzima nitrogenase, responsável pelo processo de redução do N_2 a NH_3 , é muito dependente de P e de outros elementos, como o Fe, Mo e Mg (MORTENSON; THORNELEY, 1979; OLIVEIRA et al., 2002) que podem estar restritos na rizosfera, sendo que os FMA podem suprir esta necessidade, resultando numa maior nodulação e eficiência da FBN (AMORA-LAZCANO et al., 1998), maior absorção de nutrientes pela planta e, conseqüentemente, aumento da taxa fotossintética e melhor micorrização, já que o FMA é dependente dos fotossintatos do hospedeiro, assim como o rizóbio. Estas dependências podem acarretar numa competição entre os simbioses por carbono, na qual o FMA parece se sobressair (MORTIMER et al., 2008). Kaschuk et al. (2010) revisaram estudos com 12 espécies de leguminosas e concluíram que a simbiose FMA-rizóbio-leguminosa aumenta a taxa fotossintética e a produção de grãos das leguminosas numa proporção que compensa a transferência de fotossintatos da planta para os microrganismos.

Silveira et al. (1995) incluíram mais um grupo de organismos promotores do crescimento de plantas (PCP), as bactérias fluorescentes *Pseudomonas* sp., no estudo entre FMA e plantas de feijão inoculadas com *Rhizobium tropici*, e obtiveram interações significativas de *Pseudomonas* com os FMA, resultando em aumentos no crescimento

das raízes, nodulação, absorção e eficiência de utilização de N e P pelo feijoeiro. Os autores atribuem à influência benéfica de alguns isolados de *Pseudomonas* na associação micorrízica (AM) alguns fatores, como o controle de eventuais patógenos e a produção de hormônios, vitaminas e sideróforos, que poderiam contribuir para o desenvolvimento da AM.

A ocorrência e eficiência de fixação de outros grupos de diazotróficos, incluindo os de vida-livre, também são promovidas pelos FMA (VOLPIN; KAPULNIK, 1994; ANDRADE et al., 1998; AMORA-LAZCANO et al., 1998; BAREA et al., 2002). Miyauchi et al. (2008) obtiveram maior colonização de raízes de milho por bactérias diazotróficas quando *Glomus clarum* foi inoculado. A presença desta mesma espécie de fungo estimulou as populações de bactérias fixadoras de N de vida livre em arroz de sequeiro, mas não em arroz alagado (RAIMAM et al., 2007).

Sala et al. (2007) obtiveram aumento na colonização de raízes de trigo por bactérias diazotróficas quando a planta foi inoculada com *Acaulospora* sp., porém as plantas apresentaram maior crescimento quando as bactérias e os fungos foram inoculados isoladamente. Outros experimentos também resultaram em menor desenvolvimento da planta quando os dois grupos de microrganismos foram inoculados em conjunto (BERTA et al., 1995; ANDRADE et al., 1998), o que pode ser atribuído a espécies de FMA mais agressivas e ao estado nutricional do solo (GRAHAM; ABBOTT, 2000) ou às mudanças na exsudação radicular, no metabolismo de carboidratos das raízes e no pH da rizosfera provocadas pelo FMA que podem afetar a comunidade de bactérias promotoras do crescimento de plantas (PCP) (MARSCHNER; BAUMANN, 2003).

Os FMA podem ser benéficos na dispersão de bactérias diazotróficas, uma vez que seus esporos podem ser colonizados por estas bactérias (XAVIER; GERMIDA, 2003). A FBN, por sua vez, pode promover o desenvolvimento da micorriza (PUPPI et al., 1994). Algumas bactérias podem estimular a germinação de esporos de FMA e a ramificação de suas hifas, resultando no aumento da quantidade de micélio que coloniza as raízes (MOSSE, 1959; BAREA et al., 2002).

O efeito das bactérias PCP no desenvolvimento dos FMA e micorrização pode ser positivo (WILSON et al., 1988; BAREA et al., 1997; BUDI et al., 1999; GRYNDLER

et al., 2000) ou nulo (GRYNDLER, 2000; BAREA, 2000; RAIMAM et al., 2007; MIYAUCHI et al., 2008). Segundo Johansson et al. (2004), existe possibilidade que as bactérias da micorrizosfera afetem a receptividade e o reconhecimento dos FMA e raízes, influenciem o crescimento e germinação dos propágulos fúngicos e modifiquem a bioquímica do solo rizosférico.

2.6 Interação entre minhocas e FMA

As minhocas e os FMA favorecem o crescimento vegetal através de mecanismos distintos (ver tópicos anteriores) que, se somados, podem resultar em maior desenvolvimento das plantas (BROWN et al., 2000b; YU et al., 2005; MA et al., 2006; ZAREA et al., 2009) ou não representarem uma interação de grande importância (TUFFEN et al., 2002; EISENHAUER et al., 2009).

Os primeiros estudos sobre a interação minhoca e FMA demonstraram que as minhocas podem atuar como vetores de propágulos de FMA, aumentando, principalmente, a dispersão dos esporos no solo (RABATIN; STINNER, 1988, 1989; REDDELL; SPAIN, 1991; GANGE, 1993; LEE et al., 1996).

Ao contrário dos trabalhos anteriores, Pattinson et al (1997) não observaram efeito na dispersão de *Glomus intraradices* por *Aporrectodea trapezoides* e, na presença da minhoca, relataram diminuição da colonização radicular pelo FMA em trevo (*Trifolium subterraneum*). Wurst et al. (2004) avaliaram as mesmas espécies de minhoca e fungo em solo cultivado com *Plantago lanceolata*, planta herbácea medicinal comum na Europa e Ásia, e relatam que as minhocas não afetaram a colonização radicular pelo FMA. Patrón et al. (1999) obtiveram efeito negativo da minhoca *P. corethrurus* na colonização de FMA em raízes de *Brachiaria decumbens* fertilizadas ou não com fósforo, enquanto que Brown et al. (2000b) obtiveram resultados de efeito positivo e negativo em estudos no mesmo tipo de solo, planta e espécie de minhoca, sendo que nos tratamentos sem fertilizantes, a interação minhoca-micorriza aumentou a produtividade da pastagem em 84% e houve incremento da colonização de FMA na camada de solo até 10 cm de profundidade, mas nos solos adubados com N houve

redução da colonização na presença de minhocas. Ydrogo (1994) também confirma o potencial de *P. corethrurus* para aumentar a taxa de colonização micorrízica em três plantas ornamentais e frutíferas.

Como as minhocas se deslocam pelo perfil, movimentam grande quantidade de solo (SCHEU, 1987) e, determinadas espécies seletivamente se alimentam de micélio (BONKOWSKI et al., 2000), em algumas situações, como condições experimentais onde há restrição de espaço e alimento, as minhocas podem causar danos físicos às hifas e diminuir a colonização radicular pelo FMA. Jasper et al. (1989) afirmam que os distúrbios mecânicos do solo reduzem a infecção das raízes pelas hifas de FMA. Outra hipótese que explica o efeito negativo da inoculação de minhoca e FMA na colonização radicular é o aumento na disponibilidade de nutrientes no solo proporcionado pela atividade das minhocas, que pode reduzir a dependência da planta à micorrização (WURST et al., 2004).

Tuffen et al. (2002) demonstraram que *Aporrectodea caliginosa*, espécie de minhoca endogêica, consumidora de grande quantidade de solo, promoveu a mineralização de P orgânico e maior crescimento das plantas de alho-poró (*Allium porrum* L.), espécie vegetal muito dependente da micorrização, e este processo foi mais significativo que a transferência de P entre plantas micorrizadas por hifas interconectadas que podem ser consumidas ou danificadas pela minhoca. Este hábito parece não alterar a taxa de colonização micorrízica em alho-poró e em três espécies vegetais, uma pertencente à família das gramíneas, outra a leguminosas e ainda outra à família Plantaginaceae (EISENHAUER et al., 2009). Em contrapartida, Zarea et al. (2009) obtiveram a melhor taxa de colonização micorrízica por *Glomus mosseae* em raízes de trevo quando minhocas foram inoculadas.

Com exceção de alguns estudos com *P. corethrurus* e *Pheretima* sp. (BROWN et al., 2000b; YU et al., 2005; MA et al., 2006; ZAREA et al., 2009), a maioria dos trabalhos investiga interações entre espécies que ocorrem na Europa. Até o momento, somente Ortiz-Ceballos et al. (2007) usaram uma espécie nativa dos trópicos, *Balanteodrilus pearsei*, e observaram que sua presença aumentou a colonização de FMA, a absorção de N pelo milho (*Zea mays*) e a biomassa aérea e radicular da planta em solo com restos vegetais de *Mucuna pruriens*. No entanto, quando as minhocas e

os resíduos vegetais foram avaliados separadamente, houve redução da colonização radicular pelo FMA, mostrando a importância de todos os componentes (resíduo vegetal, macrofauna e microrganismos) para o desenvolvimento ótimo das plantas.

2.7 Interação entre minhocas e diazotróficos

Os relatos iniciais sobre a interação de minhocas com bactérias fixadoras de N sugeriam que as minhocas não tinham influência sobre estas bactérias e, ao contrário dos outros grupos de microrganismos, as populações de *Azotobacter* diminuíam quando passavam pelo trato digestivo das minhocas, contrariando o primeiro estudo feito em 1928, no qual Stöckli afirmava que os coprólitos favoreciam a presença de *Azotobacter*, afirmação que, por sua vez, está sendo confirmada pelos estudos mais recentes que mostram que as minhocas podem contribuir para a fixação do nitrogênio, embora numa proporção pequena se comparada à fixação total de N no solo (EDWARDS; BOHLEN, 1996, ZAREA et al., 2009).

As relações entre minhocas e microrganismos, incluindo os diazotróficos, ocorrem na drilosfera, região que corresponde ao volume total do solo sobre influência das minhocas, incluindo a superfície do corpo, o trato intestinal e outras estruturas internas das minhocas que estão em contato com o solo ingerido, assim como as estruturas externas (coprólitos e túneis) criadas pela atividade das minhocas (BROWN et al., 2000a).

Em resumo, as minhocas alteram as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo e favorecem a atividade microbiana na drilosfera, aumentando a disponibilidade de nutrientes para os microrganismos e produzindo muco e enzimas que estimulam o crescimento microbiano (EDWARDS, 2004). Bhatnagar (1975) estima que 40% do total de diazotróficos aeróbios e 13% do total de bactérias fixadoras de N anaeróbias ocorrem na zona de 2 mm de solo ao redor dos túneis feitos pelas minhocas, em área de pastagem, na França.

A atividade da nitrogenase de bactérias diazotróficas de vida livre foi até 10 vezes maior em coprólitos do que no solo não ingerido por minhocas (EDWARDS;

BOHLEN, 1996). Resultado semelhante foi encontrado por Shaw e Pawluk (1986) para a atividade da nitrogenase de *Spirillum* sp na superfície de túneis criados pelas minhocas em relação ao solo ao redor.

Zarea et al. (2009) também obtiveram a melhor atividade da nitrogenase na rizosfera de trevo (*Trifolium alexandrinum*) quando houve a co-inoculação de minhoca e FMA. Estes dois organismos se mostraram importantes na recuperação de áreas contaminadas, pois promoveram maior quantidade de nódulos de bactérias diazotróficas nas raízes de leucena (MA et al., 2006) e, neste estudo, a interação entre minhoca, FMA e diazotróficos possibilitou maior colonização micorrízica, aumento da absorção de N, P e K e redução em 25% da absorção de elementos tóxicos (Pb e Zn) pelas plantas, levando a 30% de aumento na biomassa aérea da leucena. Doube et al. (1994) também afirmam que *Aporrectodea* sp., gênero de minhoca amplamente distribuída no sul da Austrália, aumenta a dispersão e nodulação de *Rhizobium* sp. nas raízes, mas isto não afeta significativamente o crescimento vegetal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi instalado em casa de vegetação no campus da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) (22°42' 30" S, 47°38' 30" W e 546 m de altitude) no período de outubro de 2008 a junho de 2009. A temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%) obtidas durante a condução do experimento estão apresentadas na Figura 1.

Figura 1 - Médias quinzenais de temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%) na casa de vegetação

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 2x2x2, com três fatores: presença e ausência de minhoca (*Amyntas corticis*), presença e ausência de FMA (*Gigaspora rosea*), e presença e ausência de bactéria diazotrófica (isolado S32274 obtido por NERONI, 2007). Os tratamentos estão apresentados na Tabela 1. Os oito tratamentos tiveram oito repetições cada, distribuídas em quatro blocos, totalizando 64 unidades experimentais (vasos). A metade dos vasos foi avaliada 150 dias após o transplântio (Época 1) e o restante no final do experimento, 250 dias após o transplântio (Época 2).

Tabela 1 - Descrição dos tratamentos em relação à inoculação (+) ou não inoculação (-) dos organismos

Tratamentos	Siglas	<i>Amyntas corticis</i>	<i>Gigaspora rosea</i>	Isolado diazotrófico S32274
T1	M+ F+ B+	+	+	+
T2	M+ F+ B-	+	+	—
T3	M+ F- B+	+	—	+
T4	M+ F- B-	+	—	—
T5	M- F+ B+	—	+	+
T6	M- F+ B-	—	+	—
T7	M- F- B+	—	—	+
T8	M- F- B-	—	—	—

Inicialmente, as sementes de *A. angustifolia* passaram pelo processo de desinfestação superficial em solução de hipoclorito de sódio a 0,6% durante 30 minutos e lavagem em água esterilizada. Foi feito um corte de aproximadamente 3 mm na ponta de cada semente, a fim de acelerar o processo de germinação (MOREIRA-SOUZA; CARDOSO, 2003) e, imediatamente após o corte, as sementes foram colocadas para germinar em bandejas com areia lavada e autoclavada por duas horas a 121°C.

Sessenta dias após a semeadura, as mudas de araucária, com aproximadamente 13 cm de altura, foram transplantadas para vasos de 10 litros de capacidade, preenchidos com 4 kg de substrato composto por solo (Latosolo Vermelho distroférico) e esterco bovino, coletados dentro do campus da ESALQ, que foram misturados na proporção de 1 kg de esterco para cada 90 kg de solo (Tabela 2). O esterco foi seco ao sol, peneirado em malha 5 mm antes de ser misturado ao solo e foi adicionado como fonte de matéria orgânica. O substrato foi previamente autoclavado a 121°C por duas horas. Os teores de argila e matéria orgânica do substrato ficaram próximos aos valores encontrados no solo sob Floresta de Araucária, em Campos do Jordão, São Paulo, onde as minhocas foram coletadas (BARETTA et al., 2007).

Tabela 2 - Caracterização físico-química do substrato utilizado no experimento

pH CaCl ₂ (0,01 mol L ⁻¹)	MO g dm ⁻³	P -- mg dm ⁻³	S -----mmolc dm ⁻³	K	Ca	Mg	H+Al	Areia	Silte	Argila
5,8	91	175	122	35	65	25	28	4	68	28

Nos tratamentos com FMA e minhocas, cada vaso foi inoculado com quatro minhocas cliteladas *A. corticis*, inseridas a 5 cm abaixo da superfície do substrato, e suspensão aquosa com 50 esporos de *G. rosea*, direcionada para as raízes da araucária. Antes da inoculação, as minhocas permaneceram 48 horas em placas de Petri com papel absorvente úmido, para limpeza do trato intestinal, e foram lavadas em água destilada e pesadas, sendo a massa fresca média individual 1,1 gramas. Cada vaso, portanto, recebeu aproximadamente 4,4 gramas de minhoca. Para evitar a saída das minhocas, uma tela do tipo sombrite monofio de 50% de transparência foi colocada na abertura superior dos vasos (Anexo A). Os esporos de *G. rosea* foram provenientes da coleção de FMA do Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Ciência do Solo da ESALQ.

Para a inoculação do substrato com as bactérias diazotróficas, o isolado S32274 foi cultivado em 210 mL de meio carbono combinado (RENNIE, 1981) a 28°C sob agitação até saturação visual do meio, sendo a cultura armazenada a 4°C até o momento da inoculação. A concentração do inoculante foi 10³ UFC/mL e, em cada vaso, foram aplicados 10 mL do inoculante próximo às raízes de araucária.

Durante a condução do experimento foi utilizada água destilada e autoclavada para umedecer o substrato três vezes por semana, em quantidades que mantivessem 25 a 33% de umidade gravimétrica, faixa que corresponde a aproximadamente 70% da capacidade de retenção de água do substrato, ideal para a sobrevivência de *Amyntas* sp. Este valor foi obtido em ensaio prévio.

Foram aplicados dois tipos de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada por Sarruge (1975), de acordo com os tratamentos: uma solução completa nos tratamentos sem bactérias diazotróficas, e outra solução com omissão de nitrogênio nos tratamentos com diazotróficos. Quinzenalmente, cada vaso recebeu 100 mL de solução nutritiva contendo 210, 0,4, 98, 100, 9,6 e 13 µg de N, P, K, Ca, Mg e S, respectivamente.

A altura das plantas (comprimento do caule) e o diâmetro do caule foram medidos quinzenalmente por régua milimetrada e paquímetro. O crescimento das plantas foi calculado pela diferença entre a altura e diâmetro da planta nas épocas de avaliação (Época 1 = 150 dias e Época 2 = 250 dias após o transplântio), e altura e diâmetro das mudas no momento do transplântio.

Nas Épocas 1 e 2 foram avaliados os seguintes parâmetros: (a) sobrevivência, reprodução e massa fresca de minhocas; (b) massa seca das raízes e (c) massa seca da parte aérea; (d) concentração e conteúdo total de nitrogênio e fósforo da parte aérea; (e) densidade de esporos de *G. rosea* no substrato; e (f) taxa de colonização radicular pelo FMA.

A sobrevivência das minhocas foi aferida após peneiramento do substrato do vaso, contando-se o número de minhocas, jovens e adultas. Foram consideradas adultas as minhocas que apresentavam clitelo bem desenvolvido. As minhocas foram lavadas em água corrente, secas em papel toalha e pesadas após sua contagem, chegando-se à massa fresca de minhocas.

Para obtenção da biomassa das plantas, as raízes foram separadas da parte aérea da planta, lavadas em água corrente para retirar o excesso de substrato aderido, identificadas e a parte aérea e a raiz, separadamente, foram colocadas em sacos de papel para secagem em estufa de circulação forçada de ar a 60°C até peso constante.

Após sua pesagem, as amostras da parte aérea foram moídas em moinho com peneira de 60 mesh para avaliar a composição de nutrientes da planta. O nitrogênio da parte aérea foi extraído por digestão sulfúrica e sua concentração foi determinada pelo método semi-micro-Kjeldahl, e o fósforo da parte aérea foi extraído por digestão nítrico-perclórica e sua concentração foi determinada por colorimetria do metavanadato em espectrofotômetro (MALAVOLTA et al., 1989). A partir destes resultados e da biomassa das plantas, o conteúdo total de N e P da parte aérea foi calculado.

Para as avaliações no substrato, foram amostrados aproximadamente 200 g de substrato de cada vaso, separados e identificados em sacos plásticos. A densidade de esporos de *G. rosea* foi obtida por contagem do número de esporos, usando microscópio estereoscópico (aumento de 40 vezes), após peneiramento úmido

(GERDEMANN; NICOLSON, 1963) e centrifugação em sacarose (JENKINS, 1964) de 50 g de substrato.

Para obtenção da taxa de colonização radicular pelo FMA, as raízes de *A. angustifolia* passaram por uma preparação: foram clareadas em 10% KOH e 10% H₂O₂, coradas com tinta de caneta azul e submersas em lactoglicerol (VIERHEILIG et al., 1998). A observação das estruturas de colonização do FMA foi feita em microscópio óptico segundo o “slide method” citado por Giovannetti e Mosse (1980). Foram montadas cinco lâminas para cada unidade experimental (vaso), contendo dez segmentos de raízes de, aproximadamente, 1 cm em cada lâmina, resultando na avaliação de 50 segmentos de raiz por vaso, realizada por um avaliador que atribuiu uma nota de 0 a 100 para cada segmento, conforme a intensidade de colonização radicular observada. Como este método é subjetivo, foi realizado por um só avaliador.

Os atributos químicos para caracterização do substrato foram: pH em CaCl₂, matéria orgânica (método Walkey-Black), teores de fósforo (método da resina), enxofre, potássio, cálcio, magnésio e alumínio trocáveis, conforme metodologia descrita em van Raij et al. (2001).

Os dados de porcentagem de sobrevivência das minhocas, quantidade de minhocas jovens, biomassa das plantas e das minhocas, crescimento da planta em altura e diâmetro, colonização radicular, densidade de esporos, concentração de N e P da parte aérea e conteúdo total de N e P da parte aérea foram submetidos à análise de variância, com aplicação do teste de médias de Duncan, a 5% de probabilidade para os fatores ou interações significativas. A homogeneidade de variância dos resultados foi testada e houve transformações dos seguintes dados: densidade de esporos para $(x + 0,5)^{1/2}$, número de minhocas jovens para $1/(x + 0,5)^{1/2}$ porcentagem de colonização radicular para $\arcsin (x/100)^{1/2}$ e concentração de P da parte aérea para $1/x$. Foi utilizado o programa estatístico SAS versão 8.2 (SAS, 2002) para estas análises.

A análise de componentes principais (ACP) foi realizada no programa para estatística multivariada CANOCO versão 4.0 (ter BRAAK; SMILAUER, 1998); como variáveis respostas foram consideradas a massa seca da parte aérea (MPA), massa seca de raízes (MR), e o crescimento da planta em altura e diâmetro. As variáveis explicativas foram: colonização radicular (CR), densidade de esporos (N esporos),

concentração de N e P ($[N]$ e $[P]$) da parte aérea, conteúdo total de N e P da parte aérea (N total e P total) e massa fresca de minhocas (MM). Somente as variáveis explicativas significativas foram incluídas no modelo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Colonização e esporulação do FMA

A colonização radicular (CR) por *Gigaspora rosea* variou de 7,9 a 33,3% entre os quatro tratamentos com FMA e as duas épocas de avaliação, aos 150 e 250 dias após o transplântio (Tabela 3). Estes valores são semelhantes àqueles encontrados em áreas nativa e reflorestada de *Araucaria angustifolia* por Moreira-Souza et al. (2003) e Moreira et al. (2006), nos quais a taxa de colonização radicular por diversos FMA variou de 10,7 a 40,0%.

A porcentagem de colonização radicular nem sempre é uma característica segura para definir o efeito do FMA sobre sua planta hospedeira, uma vez que, dependendo das condições ambientais e das espécies de fungos e vegetais, às vezes, valores baixos de colonização radicular podem ser suficientes para resultar em promoção do desenvolvimento da planta enquanto que, em outras combinações de FMA e hospedeiro, uma maior colonização das raízes pode não promover o crescimento da planta (MOREIRA-SOUZA; CARDOSO, 2002).

Houve diferença na taxa de colonização radicular entre as épocas de avaliação, sendo que a colonização foi maior aos 150 dias do que aos 250 dias após o transplântio (Tabela 3). Inúmeros fatores inerentes à planta hospedeira (fisiologia, fenologia, sanidade etc), às propriedades químicas e físicas do solo e às condições ambientais (temperatura, umidade) podem influenciar a colonização micorrízica. Provavelmente, a planta mais jovem, com sistema radicular menos desenvolvido, necessita mais da associação micorrízica do que a planta mais velha, com sistema radicular bem estabelecido. Além disso, as condições ambientais podem ter sido mais adequadas para uma boa micorrização na Época 1.

Os mecanismos que regulam a colonização micorrízica são pouco conhecidos, mas sabe-se que a formação e o funcionamento da simbiose dependem de um complexo processo de troca de sinais entre os simbiossiontes e que a concentração de fósforo na planta pode afetar a micorrização, uma vez que o P pode modificar o balanço de açúcares e de fitormônios da planta, além da expressão de genes de defesa vegetal

(KIRIACHEK et al., 2009). Em geral, algumas condições de restrição do crescimento vegetal, como a baixa disponibilidade de P no solo e, principalmente na planta, favorecem o desenvolvimento pleno da simbiose (KOIDE; LI, 1990; NOGUEIRA; CARDOSO, 2006).

A densidade de esporos também variou entre a Época 1 e Época 2. Os resultados foram contrários aos obtidos pela taxa de colonização radicular, sendo a maior quantidade de esporos obtida na Época 2, quando a colonização radicular foi menor. Parece que as condições ótimas para o FMA colonizar as raízes não são as mesmas para a esporulação. Em áreas de mata nativa e reflorestamento de Araucária, no verão quente e chuvoso, a colonização radicular foi maior e foram encontrados poucos esporos de FMA enquanto que, no inverno mais seco e com temperaturas amenas foi observado o oposto, a colonização radicular foi menor e a esporulação maior (MOREIRA et al., 2006). Na Época 2, quando foi encontrada menor colonização radicular e maior quantidade de esporos no substrato, a temperatura na casa de vegetação tinha diminuído repentinamente (Figura 1). É possível que, condições mais estressantes para o FMA provoquem um maior estímulo à esporulação.

Tabela 3 - Taxa de colonização radicular (%) e densidade de esporos (esporos 50 g⁻¹ substrato) de *Gigaspora rosea* em *Araucaria angustifolia*, nas duas épocas de avaliação

Tratamentos ^{1,2}	Colonização radicular			Densidade esporos		
	Época 1	Época 2	Médias	Época 1	Época 2	Médias
T1 (M+ F+ B+)	17,3	9,5	13,5 b*	129	544	336 a
T2 (M+ F+ B-)	26,0	10,2	18,1 ab	79	434	256 a
T5 (M- F+ B+)	20,9	7,9	14,4 b	79	912	495 a
T6 (M- F+ B-)	33,3	12,2	22,8 a	81	754	417 a
Médias	24,4 A*	9,9 B	³ CV = 57 %	92 B	661 A	CV = 34 %

¹ As plantas que não foram inoculadas com FMA não apresentaram indícios de colonização micorrízica

² M: minhoca, F: FMA, B: bactéria diazotrófica, +: presença, -: ausência;

³ CV: Coeficiente de variação

(*) letras minúsculas comparam as médias entre os tratamentos, nas colunas, e letras maiúsculas comparam as médias entre as épocas de avaliação, nas linhas. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si segundo o teste de médias de Duncan (P < 0.05).

As condições químicas e granulométricas do solo também podem afetar a porcentagem de colonização radicular por uma mesma espécie de FMA (CARDOSO, 1986). Por exemplo, o substrato utilizado neste experimento apresenta teor de argila maior que o teor de areia, é rico em nutrientes (tabela 2) e a taxa de colonização média avaliada no final do experimento, no oitavo mês foi 9,9%. Moreira-Souza e Cardoso (2002) avaliaram araucárias um ano após o transplante em casa de vegetação, sob diferentes doses de P, e encontraram taxa média de colonização radicular por *G. rosea* de 19,9%, ou seja, estas plantas estavam mais velhas e tiveram o dobro de raízes colonizadas se comparadas às plantas do presente estudo. Dentre as inúmeras diferenças dos dois trabalhos (temperatura, umidade, variabilidade genética das plantas, número de esporos introduzidos, subjetividade do avaliador etc.), o tipo de solo usado no estudo das autoras era pobre em nutrientes e apresentava alto teor de areia, o que pode ter contribuído para a maior colonização das raízes por *G. rosea*.

As plantas que foram inoculadas somente com *G. rosea* (T6) apresentaram maior colonização radicular do que as plantas inoculadas com diazotróficos e FMA em conjunto (T1 e T5, Tabela 3). Com o intuito de avaliar a fixação biológica do nitrogênio pelos diazotróficos, as plantas inoculadas com bactéria diazotrófica não receberam N mineral da solução nutritiva. A falta da adubação nitrogenada nestes tratamentos pode ter contribuído para menor colonização das raízes, mesmo o substrato sendo rico em matéria orgânica (Tabela 2). Simões e Couto (1973) demonstraram que a *A. angustifolia* é muito dependente de N, fato que poderia acarretar a restrição deste elemento para os FMA e, conseqüentemente, menor colonização radicular. Outra hipótese é a competição das bactérias e fungos por fotossintatos da planta (MORTIMER et al., 2008) que, por sua vez, poderia desfavorecer a colonização pelo FMA nestes tratamentos (T1 e T5).

A taxa de colonização radicular não foi afetada pela presença de minhocas (Tabela 3). As espécies de minhocas *Aporrectodea caliginosa* e *Lumbricus terrestris*, inoculadas junto com o FMA *Glomus intraradices*, também não alteraram a micorrização em três espécies vegetais (*Lolium perenne*, *Trifolium pratense* e *Plantago lanceolata*) (EISENHAUER et al., 2009).

Em geral, as condições de disponibilidade de nutrientes, de forma balanceada, inibem uma boa colonização do FMA, ou até mesmo impedem que a simbiose se estabeleça, resultando em efeitos pouco expressivos na planta (CARDOSO 1985; CARDOSO et al., 1986; SMITH; GIANINAZZI-PEARSON, 1988; NOGUEIRA; CARDOSO, 2006). No presente trabalho, houve resposta da inoculação do FMA sobre a taxa de colonização radicular das plantas, mesmo utilizando um substrato rico em MO e P (Tabela 2), o que talvez possa ser explicado pela grande demanda da araucária por nutrientes, principalmente por N e P (SIMÕES; COUTO, 1973). Embora o valor de P no substrato seja alto, já se verificou que algumas plantas perenes, como café, citrus e araucária, apresentam boa colonização e têm seu crescimento estimulado pela presença do FMA, mesmo em concentrações de P consideradas altas (ANTUNES et al., 1988; MELLONI et al., 2000; MOREIRA-SOUZA; CARDOSO, 2002).

A densidade de esporos variou de 79 a 912 esporos por 50 g de substrato e, embora este intervalo seja grande, não houve discriminação entre esses valores, por causa do alto coeficiente de variação (Tabela 3).

Ao comparar as épocas de avaliação, obteve-se diferença entre os resultados: a densidade de esporos de *G. rosea* foi significativamente maior na segunda avaliação do experimento, 250 dias após o transplantio (Tabela 2). Moreira et al. (2007b) usaram mudas de *A. angustifolia* como planta hospedeira para avaliar a esporulação e diversidade de FMA em diferentes substratos e também observaram baixa esporulação na primeira avaliação de *A. angustifolia*, aos 120 dias, e aumento desta variável nas avaliações finais, aos seis meses e um ano de idade da planta. Os autores consideram difícil estabelecer um padrão de esporulação dos FMA, uma vez que a esporulação é variável de acordo com as condições edáficas e a especificidade FMA-hospedeiro, mas citam alguns trabalhos que relataram padrões de esporulação distintos entre plantas anuais e perenes, sendo que a fenologia das plantas perenes parece ter profunda influência na esporulação dos FMA.

4.2 Altura e diâmetro das plantas

O crescimento das plantas foi avaliado nas duas épocas, 150 e 250 dias após o transplântio, e não houve diferença entre os tratamentos para esta variável (Tabela 4). Nem sempre a altura e diâmetro são critérios adequados para comparar o desenvolvimento das plantas sob diferentes tratamentos. Neste caso, a biomassa das plantas se revela mais adequada porque considera o crescimento de todas as partes vegetais.

Tabela 4 – Médias de altura (cm) e diâmetro (mm) de *Araucaria angustifolia* nas duas épocas de avaliação

Tratamentos ¹	Altura	Diâmetro	Altura	Diâmetro
	Época 1		Época 2	
T1 (M+ F+ B+)	34,6	2,9	49,0	5,9
T2 (M+ F+ B-)	30,7	2,8	39,0	5,4
T3 (M+ F- B+)	30,2	2,5	39,8	5,3
T4 (M+ F- B-)	32,8	2,7	45,2	5,4
T5 (M- F+ B+)	35,7	3,1	49,8	5,4
T6 (M- F+ B-)	39,0	2,7	50,8	6,2
T7 (M- F- B+)	35,5	2,8	48,0	6,2
T8 (M- F- B-)	31,7	2,6	49,2	6,0
² CV (%)	19,3	20,5	16,2	11,2

¹M: minhoca, F: FMA, B: bactéria diazotrófica, +: presença, -: ausência

²CV: Coeficiente de variação

O tipo de substrato utilizado na produção de mudas de araucária parece influenciar o crescimento da planta em altura. Em ensaio realizado nas mesmas condições experimentais, porém utilizando a mistura de FMA *Glomus clarum* e *Gigaspora rosea* para inoculação das araucárias, e um substrato inferior em nutrientes e com maior teor de areia, as plantas avaliadas na mesma época apresentaram quase a metade da altura e 4,6 vezes menor biomassa que as plantas do presente estudo (LIMA et al., 2009). Isto mostra que, mesmo inoculando o FMA em araucária, o solo

precisa ter o mínimo de condição de fertilidade para o crescimento adequado da planta. Na produção comercial de mudas florestais em viveiros, cujo objetivo seja alcançar a máxima produtividade, estes resultados podem ser considerados em conjunto com uma avaliação econômica pertinente.

4.3 Biomassa das plantas

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para massa seca da parte aérea (MPA) na primeira avaliação, mas no final do experimento, 250 dias após o transplântio, as plantas inoculadas somente com FMA (T6) apresentaram maior MPA, diferindo de todas as demais (Tabela 5).

Tabela 5 - Massa seca da parte aérea – MPA (g), massa seca da raiz – MR (g), e índice MPA/MR de *Araucaria angustifolia*, nas duas épocas de avaliação

Tratamentos ¹	MPA	MR	MPA/MR	MPA	MR	MPA/MR
	Época 1			Época 2		
T1 (M+ F+ B+)	41,6 a*	20,9 ab	2,0 a	61,2 bc	24,4 abc	2,5 abc
T2 (M+ F+ B-)	42,3 a	20,5 ab	2,0 a	64,6 b	25,2 ab	2,6 abc
T3 (M+ F- B+)	34,1 a	<u>18,7 b</u>	1,8 a	<u>49,9 c</u>	<u>15,1 d</u>	2,9 ab
T4 (M+ F- B-)	34,9 a	<u>18,7 b</u>	1,9 a	53,0 bc	<u>17,6 cd</u>	3,0 a
T5 (M- F+ B+)	44,7 a	22,8 a	1,9 a	60,3 bc	24,3 abc	2,3 bc
T6 (M- F+ B-)	40,8 a	21,1 ab	1,9 a	<u>81,6 a</u>	<u>26,7 a</u>	3,0 a
T7 (M- F- B+)	39,2 a	21,2 ab	1,8 a	64,0 b	<u>31,5 a</u>	<u>2,0 c</u>
T8 (M- F- B-)	35,7 a	19,8 ab	1,8 a	57,9 bc	18,6 bcd	3,2 a
² CV (%)	17,2	11,3	11,2	13,2	18,8	15,6

¹M: minhoca, F: FMA, B: bactéria, +: presença, -: ausência

²CV: Coeficiente de variação

*Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si segundo o teste de médias de Duncan (P <0.05)

Ao contrário da maioria dos estudos revisados por Brown et al. (1999) e Scheu (2003), nos quais a presença de minhocas aumentou significativamente a biomassa de

diferentes espécies vegetais, a inoculação de *A. corticis* nas plantas com FMA e bactérias resultou em menor MPA quando avaliada aos 250 dias, demonstrando que as minhocas sozinhas não interferiram significativamente no desenvolvimento da planta (comparação entre tratamento controle T8 e tratamento só com minhoca T4), mas resultaram em menor desenvolvimento das plantas inoculadas com FMA e bactéria diazotrófica (comparação entre tratamento com minhoca e fungo T2 e tratamento só com fungo T6; e comparação entre tratamento com minhoca e bactéria T3 e tratamento só com bactéria T7, lembrando que estes dois últimos tratamentos não receberam adubação nitrogenada) (Tabela 5).

Nas condições experimentais, onde o espaço para as minhocas é restrito, talvez as minhocas tenham consumido ou danificado hifas e raízes, limitando o desenvolvimento dos FMA e das plantas (BONKOWSKI et al., 2000; BROWN et al., 2004).

Nas duas épocas de avaliação, os valores mais baixos de massa seca de raízes (MR) foram de plantas inoculadas com minhocas e sem FMA (T3 e T4), valores estes que não diferiram da MR da testemunha (T8). Nestes tratamentos, não houve crescimento das raízes entre as épocas 1 e 2, sendo que algum fator pode ter impedido o crescimento das raízes nos últimos meses do experimento. No entanto, todas as plantas inoculadas com FMA apresentaram maior MR, sugerindo que o FMA provavelmente estimulou o crescimento das raízes.

Os valores do índice MPA/MR foram diferentes entre os tratamentos na Época 2 (Tabela 5). Na ausência das minhocas, o tratamento controle (T8) e as plantas inoculadas com FMA somente (T6) apresentaram índices maiores que os tratamentos com diazotróficos (T5 e T7). Valores maiores do índice MPA/MR podem ser interpretados de duas maneiras: (1) a nutrição da planta está adequada, as raízes absorvem nutrientes e água sem restrição e, por consequência, a planta tende a investir mais energia na parte aérea do que no crescimento de raízes (SILVEIRA, 1992) ou (2) a planta se encontra em condições desfavoráveis que limitam seu crescimento aéreo, mas ainda assim a biomassa da parte aérea é superior ao sistema radicular subdesenvolvido. As plantas do tratamento T6 se enquadrariam na primeira

interpretação enquanto que, no tratamento controle (T8), o valor baixo de MR pode ter resultado no maior índice MPA/MR.

A Figura 2 mostra o sistema radicular das araucárias na Época 1 de avaliação, quando, aparentemente, as plantas que cresceram na presença de minhocas mostraram menor desenvolvimento radicular.

Figura 2 - Sistemas radiculares de *Araucaria angustifolia* na Época 1 de avaliação. T1 (M+F+B+); T2 (M+F+B-); T3 (M+F-B+); T4 (M+F-B-); T5 (M-F+B+); T6 (M-F+B-); T7 (M-F-B+); T8 (M-F-B-), total de três repetições por tratamento. M: minhoca, F: FMA, B: bactéria, (+): presença, (-): ausência

Para a variável MPA, avaliada na Época 2, houve interação significativa entre FMA x bactéria diazotrófica e entre minhoca x FMA x bactéria diazotrófica, além do efeito negativo da inoculação de minhoca e efeito positivo da inoculação de FMA sobre a MPA (Anexo B). Ou seja, a presença de *G. rosea* em qualquer tratamento aumentou a MPA enquanto que a presença de minhoca diminuiu a MPA. Se comparado ao tratamento controle, a inoculação conjunta de *A. corticis*, *G. rosea* e do isolado diazotrófico, na ausência de adubação nitrogenada, não proporcionou maior nem menor

crescimento das mudas de araucária, mas limitou o crescimento ótimo das plantas que pode ocorrer na presença de FMA e adubação nitrogenada (T6).

4.4 Estado nutricional das plantas (P e N)

A presença do FMA aumentou significativamente a concentração de P (g kg^{-1}) da parte aérea das araucárias nas duas épocas de avaliação. Os resultados estão apresentados na Figura 3A, onde se destacam todos os tratamentos com FMA (T1, T2, T5 e T6). Outros autores também obtiveram maior concentração de P em mudas de araucária inoculadas com FMA (MOREIRA-SOUZA; CARDOSO, 2002; ZANDEVALLI et al., 2004; LIMA et al., 2009).

Na época 2, os valores de concentração de P são menores devido à diluição do P, mas ainda se destacam as plantas inoculadas com FMA. Nesta época, embora as diferenças de P total entre os tratamentos tenham se apresentado menos pronunciadas, de uma maneira geral, continuaram as mesmas tendências nas comparações dos tratamentos (Figura 3A e 3B).

A inoculação conjunta de FMA e minhoca não alterou as quantidades de P e N absorvidas e acumuladas pelas plantas (comparação dos tratamentos T2, T6 e T8, Figura 3B e 4B). Alguns autores sugerem que a interação entre FMA e minhocas não seja tão importante quanto o efeito de cada organismo separadamente sobre o desenvolvimento vegetal (TUFFEN et al., 2002; EISENHAUER et al., 2009).

A presença somente de minhocas também não influenciou o conteúdo total de P e N nas plantas (comparação T4 com T8, Figuras 3B e 4B), ao contrário de alguns resultados obtidos em outras espécies vegetais (CALLAHAM; HENDRIX, 1998; HAIMI; ENBROK, 1992; STEPHENS; DAVOREN, 1996; ZAREA et al., 2009).

Figura 3 - Concentração de P (g kg⁻¹) e P total (mg) da parte aérea de *Araucaria angustifolia* nas duas épocas de avaliação. **T1** (M+F+B+); **T2** (M+F+B-); **T3** (M+F-B+); **T4** (M+F-B-); **T5** (M-F+B+); **T6** (M-F+B-); **T7** (M-F-B+); **T8** (M-F-B-), M: minhoca, F: FMA, B: bactéria, (+): presença, (-): ausência *Médias seguidas por letras iguais na mesma época não diferem entre si segundo o teste de Duncan (P<0.05)

Na época 1 de avaliação, a concentração de N da parte aérea das plantas não variou entre os tratamentos. Já na Época 2, as plantas inoculadas com bactérias diazotróficas (tratamentos T1, T3, T5 e T7 da Figura 4A), que não receberam adubação nitrogenada, apresentaram menor concentração de N, com exceção das plantas inoculadas com minhocas e diazotróficos em conjunto (tratamento T3 da Figura 4A). Provavelmente, esta exceção é decorrente do efeito de diluição nos outros tratamentos, cujas plantas apresentaram maior crescimento que as plantas do tratamento T3 (Tabela 5), nas quais o N ficou mais concentrado.

A variação do conteúdo total de N absorvido e acumulado pelas plantas entre os tratamentos também foi distinta entre as duas épocas de avaliação. Na Época 1, as plantas inoculadas com FMA e bactérias diazotróficas (T5) apresentaram maior conteúdo total de N do que as plantas inoculadas com minhocas, diazotróficos e FMA (T1), com minhocas e diazotróficos (T3) e com minhocas sozinhas (T4). Na Época 2, houve uma tendência de menor conteúdo total de N pelas plantas inoculadas com diazotróficos, que não receberam adubação nitrogenada (tratamentos T1, T3, T5 e T7 da Figura 4B).

Estes dados poderiam sugerir que houve fixação de N pelas bactérias ao menos no início do experimento, e somente na presença do FMA, pois neste tratamento as plantas também receberam solução completa com omissão de N. Visto a complexidade do sistema solo-planta-microrganismos, não é possível fazer generalizações a partir destes resultados, mas é possível que, na Época 1, a mineralização da MO do solo tenha fornecido N para as plantas de todos os tratamentos, mas com o passar do tempo, as formas de N disponíveis para a planta foram se exaurindo, o que resultou, na Época 2, na menor absorção de N pelas plantas que não receberam solução completa (T5 e T7), desconsiderando as plantas inoculadas com minhocas, que não apresentaram diferença no conteúdo total de N na Época 2 (T1, T2, T3 e T4, Figura 4B). As minhocas podem ter favorecido a mineralização da MO e a disponibilidade de N nas formas assimiláveis para a planta (NH_4^+ e NO_3^-). Baretta et al. (2009) incubaram *Amyntas corticis* em Latossolo Vermelho-Amarelo e obtiveram maior teor de N (NH_4^+ e NO_3^-) e P nos coprólitos das minhocas do que no solo sem minhocas, resultados que sugerem que a espécie de

minhoca inoculada no presente estudo pode aumentar a disponibilidade de nutrientes para as plantas.

Figura 4 - Concentração de N (g kg⁻¹) e N total (mg) da parte aérea de *Araucaria angustifolia* nas duas épocas de avaliação. T1 (M+F+B+); T2 (M+F+B-); T3 (M+F-B+); T4 (M+F-B-); T5 (M-F+B+); T6 (M-F+B-); T7 (M-F-B+); T8 (M-F-B-). M: minhoca, F: FMA, B: bactéria, (+): presença, (-): ausência *Médias seguidas por letras iguais na mesma curva não diferem entre si segundo o teste de Duncan (P<0.05)

Em araucária, a inoculação com o FMA não produziu efeito no conteúdo total de N (comparação T6 com T8 e T2 com T4, Figura 4). O efeito da inoculação conjunta de FMA e diazotróficos também não foi significativo, considerando que as respostas nutricionais da planta nos tratamentos T5 e T7 foram semelhantes (Figuras 3B e 4B).

4.5 Sobrevivência, reprodução e massa fresca de minhocas

A inoculação de FMA e bactéria diazotrófica não influenciou a porcentagem de sobrevivência das minhocas, que variou de 37 a 44 % na Época 1, e de 12 a 31% na Época 2. Não houve diferença significativa do número de indivíduos jovens entre os tratamentos, na Época 1, mas foi encontrada maior quantidade de minhocas jovens no substrato em que foi inoculado FMA e diazotróficos em conjunto com as minhocas, na Época 2. A massa fresca das minhocas também não variou na Época 1, mas houve diferença entre os tratamentos 1 e 2, embora não pareça haver uma causa plausível para tal diferença.

Tabela 6 – Porcentagem de sobrevivência de minhocas (Sobrev.), número de minhocas jovens (Jovens) e massa fresca das minhocas (MM), em g, sob *Araucaria angustifolia*, nas duas épocas de avaliação

Tratamentos ¹	Época 1			Época 2		
	Sobrev.	Jovens	MM	Sobrev.	Jovens	MM
T1 (M+ F+ B+)	43	10	2,8	18	6 a	1,7 a
T2 (M+ F+ B-)	37	8	2,8	12	1 b	0,3 b
T3 (M+ F- B+)	37	7	3,0	25	0,5 b	1,1 ab
T4 (M+ F- B-)	43	2	2,3	31	3 ab	0,9 ab
² CV (%)	132	70	95	113	42	73

¹M: minhoca, F: FMA, B: bactéria, +: presença, -: ausência

²CV: Coeficiente de variação

*Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si segundo o teste de médias de Duncan (P <0.05)

Os coeficientes de variação extremamente elevados demonstram que, nas condições do experimento, dificilmente haveria possibilidade de discriminação entre os

tratamentos. Talvez fosse necessário trabalhar com maior número de repetições, de 10 a 20 repetições, para obter dados mais homogêneos, o que não seria factível.

Visto que a sobrevivência das minhocas foi baixa, o experimento com *Amyntas* sp., conduzido em vasos, por médio a longo prazo, parece não ser adequado devido ao espaço restrito para as minhocas. A utilização de canteiros, devidamente separados uns dos outros, pode ser uma alternativa que simule melhor as condições reais de floresta e permita observar o efeito das minhocas sobre as plantas e microrganismos (ZAREA et al., 2009). Assim mesmo, o fato de algumas minhocas terem sobrevivido sugere que a experimentação incluindo microrganismos e meso ou macrofauna, ao mesmo tempo, são passíveis de execução e poderão trazer novas informações sobre as respectivas interações, desde que as condições sejam mais propícias para a macrofauna, neste caso, as minhocas.

4.6 Análise de Componentes Principais (ACP)

A análise de componentes principais não forneceu nenhuma novidade além do que já foi discutido, porém a figura gerada por esta análise permite uma visualização completa e conjunta de todos os fatores e variáveis avaliados. Assim, conforme esperado, os parâmetros de porcentagem de colonização radicular (CR), massa fresca de minhocas (MM) e as concentrações de P e N da planta se relacionaram com a Época 1, enquanto que o conteúdo total de N (N_{total}), o número de esporos (N_{esporos}), a massa seca da parte aérea (MPA) e o crescimento da planta em altura e diâmetro foram maiores na Época 2. Os eixos 1 (CP1) e 2 (CP2) explicaram juntos aproximadamente 90% da variabilidade total dos dados.

Figura 7 - Análise de Componentes Principais (ACP) em função das duas épocas de avaliação (Época 1 = 150 dias e Época 2 = 250 dias após o transplante). **MM**: massa fresca de minhocas, **MPA**: massa seca da parte aérea; **MR**: massa seca da raiz, **CR**: colonização radicular; **Nesporos**: número de esporos; **Ntotal**: conteúdo total de N; **[P]**: concentração de P; **[N]**: concentração de N; Tratamentos: **T1** (M+F+B+); **T2** (M+F+B-); **T3** (M+F-B+); **T4** (M+F-B-); **T5** (M-F+B+); **T6** (M-F+B-); **T7** (M-F-B+) e **T8** (M-F-B-) sendo que **M**: minhoca; **F**: FMA; **B**: bactéria diazotrófica; (+): presença; (-): ausência

5 CONCLUSÕES

A inoculação de *Gisgaspora rosea* propiciou melhor desenvolvimento das mudas de araucária, mesmo em substrato relativamente fértil.

Não houve efeito significativo da inoculação de semente diazotróficos.

A sobrevivência das minhocas foi baixa e as plantas inoculadas com minhocas apresentaram tendência de menor biomassa.

A interação dos organismos alterou a biomassa e o conteúdo de N e P das plantas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D.G.; BERGMAN, B.; NIERZWICKI-BAUER, S.A.; RAI, A.N.; SCHÜßLER, A. Cyanobacterial-Plant Symbioses. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.-H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The Prokaryotes: A Handbook on the biology of bacteria**. 3rd ed. New York:Springer, 2006. v.1, p. 331-363.
- AKIYAMA, K.; MATSUOKA, H.; HAYASHI, H. Isolation and identification of a phosphate deficiency-induced C-Glycosylflavonoid that stimulates arbuscular mycorrhiza formation in melon roots. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 15, p.334-340, 2002.
- AKIYAMA, K.; MATSUZAKI, K.; HAYASHI, H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature**, London, v. 435, p. 824-827, 2005.
- AMORA-LAZCANO, E.; VAZQUEZ, M.M.; AZCON, R. Response of nitrogen transforming microorganisms to arbuscular mycorrhizal fungi. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 27, p. 65– 70, 1998.
- ANDRADE, G.; LINDERMAN, R.G., BETHLENFALVAY, G.J. Bacterial associations with the mycorrhizosphere and hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 202, p. 79–87, 1998.
- ANDRADE, S.A.L; GRATÃO, P.L.; SCHIAVINATO, M.A.; SILVEIRA, A.P.D.; AZEVEDO, R.A.; MAZZAFERA, P. Zn uptake, physiological response and stress attenuation in mycorrhizal jack bean growing in soil with increasing Zn concentrations. **Chemosphere**, Oxford, v. 75, p. 1363-1971, jun. 2009.
- ANTUNES, V.; SILVEIRA, A.P.D.; CARDOSO, E.J.B.N. Interação entre diferentes tipos de solo e fungos micorrízicos vesículo-arbusculares na produção de mudas de café (*Coffea arabica* L.). **Turrialba**, San Jose, v. 38, n. 2, p. 117-122, 1988.
- ARAÚJO, A.S.F.; BURITY, H.A.; LYRA, M.C.C.P. Influência de diferentes níveis de nitrogênio e fósforo em leucena inoculada com *Rhizobium* e fungo micorrízico arbuscular. **Revista Ecosystema**, Espírito Santo do Pinhal, v. 26, p.35-38, 2001.
- ARRIAGADA, C.; PEREIRA, G.; GARCIA-ROMERA, I.; OCAMPO, J.A. Improved zinc tolerance in Eucalyptus globulus inoculated with *Glomus deserticola* and *Trametes versicolor* or *Coriolopsis rigida*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 118-125, Jan. 2010.
- ARTURSSON, V.; FINLAY, R.D.; JANSSON, J.K. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, p. 1-10, 2006.
- BACKES, A.; NILSON, A. D. *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, o pinheiro-brasileiro. **Iheringia: Série Botânica**, Porto Alegre, n. 30, p. 85-96, 1983.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 77, p. 549-579, 2005.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non legumes plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 29, p. 911-992, 1997.

BAPTISTA, M.J.; SIQUEIRA, J.O. Efeito de flavonóides na germinação e no crescimento assimbiótico do fungo micorrízico arbuscular *Gigaspora gigantea*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 6, p. 127-134, 1994.

BAREA, J.M. Rhizosphere and mycorrhiza of field crops. In: TOUTANT, J.P.; BALAZS, E. (Ed.). **Biological Resource Management: Connecting science and policy**. Berlin: Springer:OECD, 2000. p 110–125.

BAREA, J.M.; AZCÓN-AGUILAR, C.; AZCÓN, R. Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms within the context of sustainable soil-plant systems. In: GANGE, A.C.; BROWN, V.K. (Ed.). **Multitrophic interactions in terrestrial systems**. Cambridge: Blackwell Science, 1997. p. 65–77.

BAREA, J.M.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 81, p. 343–351, 2002

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

BARETTA, D. **Fauna do solo e outros atributos edáficos como indicadores da qualidade ambiental em áreas com *Araucaria angustifolia* no Estado de São Paulo**. 2007. 158 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

BARETTA, D.; BROWN, G.G.; JAMES, S.W.; CARDOSO, E.J.B.N. Earthworm populations sampled using collection methods in atlantic forests with *Araucaria angustifolia*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, p. 384-392, 2007

BARETTA, D.; HIRATA, S.R. ; NAKATANI, A. S. ; DECAENS, T. ; CARDOSO, E.J.B. N. Dinâmica de nitrogênio (NH_4^+ e NO_3^-) e fósforo (P) em coprólitos de minhocas (Oligochaeta). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DO SOLO, 32., 2009, Fortaleza **Anais...** Fortaleza , 2009. Resumo. 1 CD-ROM

BARTZ, M.L.C.; BROWN, G.G; PASINI, A.; LIMA, A.C.R.; GASSEN, D.N. As minhocas e o manejo do solo: o caso do plantio direto do arroz irrigado. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, v. 112, p. 4-8, 2009.

BAZZICALUPO, M.; OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. In: PEDROSA, F.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E. (Ed.). **Nitrogen fixation**: from molecules to crop productivity. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.409-410.

BERTA, G.; TROTTA, A.; FUSCONI-A; HOOKER, J.E.; MUNRO, M.; ATKINSON, D.; GIOVANNETTI, M.; MORINI, S.; FORTUNA, P.; TISSERANT, B.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. Arbuscular mycorrhizal induced changes to plant growth and root system morphology in *Prunus cerasifera*. **Tree Physiology**, Victoria, v.15, n.5, p.281-293, 1995.

BHATNAGAR, T. Lombriciens et humification: Un aspect nouveau de l'incorporation microbienne d' azote induite par les vers de terre. In: KILBERTUS, G.; REISINGER, O.; MOUREY, A.; FONSECA, J. A.C de. (Ed.) **Biodégradation et humification**. Sarreguemines: Pierron, 1975. p. 169-182.

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

BLANCHART, E.; ALBRECHT, A.; ALEGRE, J.; DUBOISSET, A.; VILLENAVE, C.; PASHANASI, B. Effects of earthworms on soil structure and physical properties. In: LAVELLE, P.; BRUSSAARD, L.; HENDRIX, P.F. (Ed.). **Earthworm management in tropical agroecosystems**. Wallingford: CAB International, 1999. p. 149-172.

BIRÓ, B.; KÖVES-PÉCHY, K.; VÖRÖS, I.; TAKÁCS, T.; EGGENBERGER, P.; STRASSER, R.J. Interrelations between *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen fixers and arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of alfalfa in sterile AMF free or normal conditions. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, p. 159–168, 2000.

BONFANTE-FASOLO, P. Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: POWELL, C.L.; BAGYARAJ, D.J. (Ed.). **VA Mycorrhiza**. Boca Raton: CRC Press, 1984. p.5-33.

BONONI, V.L.R.; GRANDI, R.A.P.; LOPES, S.A.R.; RODRIGUES, E.; FONSECA, M.P. Micorrizas vesiculo-arbusculares em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 1989. Piracicaba. **Programas e Resumos...** Piracicaba: CENA/ESALQ, 1989. 104p

BONKOWSKI, M.; GRIFFITHS, B.S.; RITZ, K. Food preferences of earthworms for soil fungi. **Pedobiologia**, Jena, v. 44, p.666–676, 2000

BOUCHÉ, M.B. Stratégies lombriciennes. In: LHOM, U.; PERSON, T. (Ed.). **Soil organisms as components of ecosystems**. Stockholm: Blackwell Publishing, 1977. p. 122-132. (Ecological Bulletins, 25).

BRAAK C.J.F ter; SMILAUER, P. **CANOCO reference manual and user's guide to Canoco for Windows**: software for canonical community ordination (version 4). New York: Microcomputer Power, 1998. 123p.

BRASIL. Portaria nº 06-N, de 15 de janeiro de 1992. Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 jan. 1992. p.870-872.

BREUNINGER, M.; EINING, W.; MAGEL, E.; CARDOSO, E.; HAMPP, R. Mycorrhiza of Brazil Pine (*Araucaria angustifolia* Bert. O. Ktze.). **Plant Biology**, Malden, v.2, p.4-10, 2000.

BROWN, G.G.; BAROIS, I.; LAVELLE, P. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 36, p. 177-198, 2000a.

BROWN, G.G.; TREJO, D.; LARA, L. Interacción entre lombrices de tierra (*Pontoscolex corethrurus*) y los hongos micorrízicos arbusculares en la nutrición y producción del pasto *Brachiaria decumbens*. In: ALARCÓN, A.; FERRERA-CERRATO, R.. (Ed.). **Ecología, fisiología e biotecnología de la micorriza arbuscular**. México D.F.: Mundi Prensa, 2000b. p. 16-38.

BROWN, G.G.; EDWARDS, C.A.; BRUSSAARD, L. How earthworms affect plant growth: Burrowing into the mechanisms. In: EDWARDS, C.A. (Ed.). **Earthworm ecology**. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. 13-49.

BROWN, G.G.; JAMES, S.W.; PASINI, A.; NUNES, D.H.; BENITO, N.P.; MARTINS, P.T.; SAUTTER, K.D. Exotic, peregrine and invasive earthworms in Brazil: Diversity, distribution and effects on soils and plants. **Caribbean Journal of Science**, Mayaguez, v. 42, n. 3, p. 339-358, 2006

BROWN, G.G.; PASHANASI, B.; VILLENAVE, C.; PATRÓN, J.C.; SENAPATI, B.K.; GIRI, S.; BAROIS, I.; LAVELLE, P.; BLANCHART, E.; BLAKEMORE, R.J.; SPAIN, A.V.; BOYER, J. Effects of earthworms on plant production in the tropics. In: LAVELLE, P.; BRUSSAARD, L.; HENDRIX, P.F. (Ed.). **Earthworm management in tropical agroecosystems**. Wallingford: CAB International, 1999. p.87-147.

BUDI, S.W.; VAN TUINEN, D.; MARTINOTTI, G.; GIANINAZZI, S. Isolation from the *Sorghum bicolor* mycorrhizosphere of a bacterium compatible with arbuscular mycorrhiza development and antagonistic towards soilborne fungal pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 5148–5150, 1999.

BUDOWSKI, G. Distribution of tropical American rain forest species in the light of sucessional processes. **Turrialba**, San Jose, v. 15, n. 1, p. 40-42, 1965.

BUÉE, M.; ROSSIGNAL, M.; JAUNEAU, A.; RANJEVA, R.; BÉCARD, G. The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 13, p. 693-698, 2000.

BURITY, H.A.; LYRA, M.C.C.P de; SOUZA, E.S de; MERGULHÃO, A.C.E.S; SILVA, M.L.R.B. Efetividade da inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares em mudas de sabiá submetidas a diferentes níveis de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.4, p. 801-807, 2000

BURTELOW, A.E.; P.J. BOHLEN, P.J.; GROFFMAN, P.M. Influence of exotic earthworm invasion on soil organic matter, microbial biomass and denitrification potential in forest soils of the northeastern United States. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 9, p.197–202, 1998.

CALLAHAM, M.A.; HENDRIX, P.F. Impact of earthworms (*Diplocardia*: Megascolecidae) on cycling and uptake of nitrogen in coastal plain forest soils from northwest Florida, USA. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 9, p. 233–239, 1998.

CARDOSO, E.J.B.N. Efeito de micorriza vesículo-arbuscular e fosfato de rocha na simbiose soja-Rhizobium.. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 9, p. 125-130, 1985.

CARDOSO, E.J.B.N. Eficiência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em soja, com *Rhizobium japonicum* e fosfato de rocha, em função do tipo de solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 10, p. 17-23, 1986.

CARDOSO, E.J.B.N; ANTUNES, V.; SILVEIRA, A.P.D.; OLIVEIRA M.H.A. Eficiência de FMA em porta-enxertos de citrus. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 10, p. 25-30, 1986.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies Florestais Brasileiras**: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1994. 639 p.

CHAOUI, H.; EDWARDS, C.A.; BRICKNER, M.; LEE, S.; ARANCON, N. Suppression of the plant diseases, Pythium (damping off), Rhizoctonia (root rot) and Verticillium (wilt) by vermicomposts. **Proceedings of Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases**. v.2, 8B-3, p. 711–716, 2002.

CHAOUI, H.I.; ZIBILSKA L.M.; OHNO, T. Effects of earthworm casts and compost on soil microbial activity and plant nutrient availability. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.35, p. 295–302, 2003

CHO, E.J.; LEE, D.J.; WEE, C.D.; KIM, H.L.; CHEONG, Y.H.; CHO, J.S.; SOHN, B.K. Effects of AMF inoculation on growth of *Panax ginseng* C.A. Meyer seedlings and on soil structures in mycorrhizosphere. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 122, p. 633-638, Nov 2009.

CLARK, R.B.; ZETO, S.K.; ZOBEL. Arbuscular mycorrhizal fungal isolate effectiveness on growth and root colonization of *Panicum virgatum* in acidic soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 31, p. 1757-1763, 1999.

CRAWFORD, R.H.; LI, C.Y.; FLOYD, M. Nitrogen fixation in root-colonized large woody residue of Oregon coastal forests. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v.92, p. 229-234, 1997

DOUBE, B.M.; RYDER, M.H.; DAVOREN, C.W.; STEPHENS, P.M. Enhanced root nodulation of subterranean clover *Trifolium subterraneum* by *Rhizobium trifolii* in the presence of the earthworm *Aporrectodea trapezoids*. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v.6, p.237–251, 1994.

DOUBE, B.M.; WILLIAMS, P.M.L.; WILLMOTT, P.J. The influence of two species of earthworm (*Aporrectodea trapezoids* and *Aporrectodea rosea*) on the growth of wheat, barley and faba beans in three soil types in the greenhouse. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p.503–509. 1997.

EDWARDS, C.A. (Ed.). **Earthworm ecology**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2004. 441 p.

EDWARDS, C.A.; BOHLEN, P.J. **Biology and ecology of earthworms**. 3rd ed., London:Chapman & Hall, 1996. 424p.

EISENHAUER, N.; PARTSCH, S.; PARKINSON, D.; SCHEU, S. Invasion of a deciduous forest by earthworms: changes in soil chemistry, microflora, microarthropods and vegetation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 1099–1110, 2007.

EISENHAUER, N.; KÖNIG, S.; SABAIS, A.C.W.; RENKER, C.; BUSCOT, F.; SCHEU, S. Impacts of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus intraradices*) on plant performance are not interrelated. . **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.41, p. 561–567, 2009.

EL HARTI, A.; SAGHI, M.; MOLINA, J.; TELLER, G. Production d'une substance rhizogène à effet similaire à celui de l'acide indole acétique par le ver de terre *Lumbricus terrestris*. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 79, p.1911–1920, 2001.

FARJON, A. 2006. *Araucaria angustifolia*. In: IUCN 2009. **IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/32975/0>>. Acesso em: 09 Dez. 2009

FONSECA, C. R.; GANADE G.; BALDISSERA R.; BECKER C.G; BOELTER C.R.; BRESCOVIT A.D.; CAMPOS L.M.; FLECK T.; FONSECA V.S.; HARTZ S.M.; JONER F.; KÄFFER M.; LEAL-ZANCHET A.M.; MARCELLI M.P.; MESQUITA A.S.; MONDIN C.A.; PAZ C.P; PETRY M.V.; PIOVENSAN F.N.; PUTZKE J.; STRANZ A.; VERGARA M.; VIEIRA E.M. Towards an ecologically sustainable forestry in the Atlantic Forest. **Biological Conservation**, Oxford, v.142, p. 1209-1219, 2009.

GANGE, A. Translocation of mycorrhizal fungi by earthworms during early succession. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 25, p. 1021–1026, 1993.

GARCIA, J. A.; FRAGOSO, C. Growth, reproduction and activity of earthworms in degraded and amended tropical open minded soils: laboratory assays. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.20, p.43–56, 2002.

GARCIA, J.A.; FRAGOSO, C. Influence of different food substrates on growth and reproduction of two tropical earthworm species (*Pontoscolex corethrurus* and *Amyntas corticis*). **Pedobiologia**, v.47, p.754-763, 2003.

GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.46, p.235-244, 1963.

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

GRAHAM, J.H.; ABBOTT, L.K. Wheat responses to aggressive and non-aggressive arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 220, p. 207–218, 2000.

GRAHAM, J.H.; LEONARD, R.T.; MENGE, J.A. Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 68, p. 548-552, 1981.

GRYNDLER, M. Interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with other soil organisms. In: KAPULNIK, Y.; DOUDS, Jr., D.D. (Ed.), **Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and function**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 239–262.

GRYNDLER, M.; HRSELOVÁ, H.; STRÍTESKA, D. Effect of soil bacteria on growth of hyphae of the arbuscular mycorrhizal (AM) fungus *Glomus claroideum*. **Folia Microbiológica**, Dordrecht, v. 45, p. 545–551, 2000.

GUERRA, M. P.; SILVEIRA, V.; REIS, M.S. dos; SCHNEIDER, L. Exploração, manejo e conservação da Araucária (*Araucaria angustifolia*). In: SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. (Ed.). **Sustentável Mata Atlântica**. São Paulo: SENAC, 2002. p. 85-101.

GUNN, A.; CHERRET, J.M. The exploitation of food resources by soil meso and macro invertebrates. **Pedobiologia**, Jena, v. 37, p. 303–320, 1993.

GURGEL FILHO, O. do A. Silvica da *Araucaria angustifolia* (Bert) O. KUNTZE. In: IUFRO MEETING ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA, 1.. 1980. Curitiba. **Forestry problems of the genus Araucaria**. Curitiba: FUPEF, 1980. p. 29-68.

HAIMI, J.; ENBROK, M. Effects of endogeic earthworms on soil processes and plant growth in coniferous forest soil. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v.13, p. 6-16. 1992.

HAIMI, J.; HUHTA, V.; BOUCELHAM, M. Growth increase of birch seedlings under the influence of earthworms-a laboratory study. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, p. 1525-1528, 1992.

HAMPSON, M.C.; COOMBES, J.W. Pathogenesis of *Synchytrium endobioticum* VII. Earthworms as vectors of wart disease of potato, **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 116, p.147–150, 1989.

HODGE, A.; CAMPBELL, C.D.; FITTER, A.H. An arbuscular mycorrhizal fungi accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. **Nature**, London, v. 413, n. 20, p. 297- 299, 2001.

HUNGRIA, M. ; CAMPO, R.J. ; CHUEIRE, L. M. O. ; GRANGE, L. ; MEGIAS, M. Symbiotic effectiveness of fast-growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 33, p. 387-394, 2001.

IMAGUIRE, N. Condições ambientais para a *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze. **Dusenía**, Curitiba, v.11, p. 121-127. 1979.

IPSILANTIS, I.; KARPOUZAS, D.G.; PAPADOPOULOU, K.K.; EHALIOTIS, C. Effects of soil application of olive mill wastewaters on the structure and function of the community of arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 2466-2477, Dec 2009.

JAMES, S.W.; SEASTEDT, T.R. Nitrogen mineralization by native and introduced earthworms: Effects on big bluestem growth. **Ecology**, Washington, v. 67, p. 1094-1097, 1986.

JASPER, D.A.; ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. Soil disturbance reduces the infectivity of external hyphae of VA mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Oxford, v. 112, p. 91-99, 1989.

JENKINS, W.R. A rapid centrifugation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.48, p.692, 1964.

JOHANSSON, J.F.; PAUL, L.R.; FINLAY, R.D. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 48, p. 1-13, 2004.

KASCHUK, G.; LEFFELAAR, P.A.; GILLER, K.E.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M.; KUYPER, T.W. Responses of legumes to rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi: A meta-analysis of potential photosynthate limitation of symbioses. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 125-128, Jan. 2010.

KERSHAW, P.; WAGSTAFF, B. The southern conifer family Araucariaceae: history, status and value for paleoenvironmental reconstruction. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 32, p. 397–414, 2001.

KIRIACHEK, S.G.; DE AZEVEDO, L.C.B.; PERES, L.E.P.; LAMBAIS, M.R. Regulation of arbuscular mycorrhizae development. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, n.1, p.1-16, Jan. 2009.

KLEIN, R.M. O aspecto dinâmico do pinheiro brasileiro. **Sellowia**, Itajaí, v. 12, n. 12, p. 17-44, 1960.

KOBIYAMA, M.; BARCIK, C.; SANTOS, H.R. Influência da minhoca (*Amyntas hawayanus*) sobre a produção de matéria seca de Bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth). **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, Curitiba, v.13, p.199-203, 1995.

KOIDE, R.T.; LI, M. Physiology of the mycorrhizal plant. In: INGRAM, D.S.; WILLIAMS P.H. (Ed.) **Advances in plant pathology**. London:Academic, 1990. p. 33–54.

KORNDÖRFER, C.L. **Desenvolvimento inicial do pinheiro brasileiro (*Araucaria angustifolia* em resposta a diferentes profundidades de enraizamento**. 2007. 50 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

KUSDRA, J. F. **Influência do Oligochaeta edáfico *Amyntas* spp. e do *Rhizobium tropici* no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1998. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1998.

LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Suppression of endochitinase, b-1-3-endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 6, p.75-83, 1993.

LAVELLE, P.; DANGERFIELD, M.; FRAGOSO, C.; ESCHENBRENNER, V.; LOPEZ-HERNANDEZ, D.; PASHANASI, B.; BRUSAARD, L. The relationship between soil macrofauna and tropical soil fertility. In: WOOMER, P.L.; SWIFT, M.J. (Ed.). **The biological management of tropical soil fertility**. New York: J. Wiley , 1994. p. 137-169.

LAVELLE, P.; SPAIN, A.V. **Soil ecology**. Dordrecht: Kluwer Academic Pub., 2001. 654p.

LAVELLE, P. Earthworms and the soil system. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v.6, p.237-251, 1988.

LEE, K.E. **Earthworms**: their ecology and relationships with soils and land use. New York :Academic Press, 1985. 411p.

LEE, K.K.; REDDY, M.V.; WANI, S.P.; TRIMURTULU, N. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in earthworm casts and surrounding soil in relation to soil management of a semi-arid tropical Alfisol. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 3, p. 177-181, 1996.

LIMA, A.R.; CAPOBIANCO, J.P.R. **Mata Atlântica: avanços legais e institucionais para sua conservação**. Brasília: Instituto Sócio Ambiental, 1997. 118p. (ISA. Documentos, 4).

LIMA, J.E de; VASCONCELLOS, R.L.F.; CARDOSO, E.J.B.N. The tripartite symbiosis between diazotrophic bacteria, arbuscular mycorrhizal fungi, and *Araucaria angustifolia* seedlings. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MYCORRIZA, 6., 2009, Belo Horizonte. **Resumo...** Belo Horizonte, 2009. 1 CD-ROM.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; LELIE, D. van der. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v.21, p 583–606, 2002.

LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B.R. Applications of freeliving plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 86, p.1-25, 2004.

MA, Y.; DICKINSON, N.M.; WONG, M.H. Beneficial effects of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi on establishment of leguminous trees on Pb/Zn mine tailings. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, p.1403-1412, 2006.

MACHINESKI, O.; BALOTA, E.L.; COLOZZI, A.; ANDRADE, D.S.; SOUZA, J.R.P de. Growth responses of peroba rosa seedlings due to arbuscular mycorrhizal fungi inoculation. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, p. 567-570, 2009.

MAHERALI, H.; KLIRONOMOS, J.N. Influence of Phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. **Science**, Washington, v. 316, p. 1746–1748, 2007.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: POTAFÓS, 1989. p. 136-145.

MARSCHNER, P.; BAUMANN, K. Changes in bacterial community structure induced by mycorrhizal colonisation in split-root maize. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.251, p. 279-289, 2003.

MEDEIROS, J.D.; GONÇALVES, M.A.; PROCHNOW, M.; SCHÄFFER, W.B. **Floresta com Araucárias: um símbolo da Mata Atlântica a ser salvo da extinção**. Rio do Sul: Apremavi, 2004. 82p.

MEDEIROS, J.D.; SAVI, M.; BRITO, B.F.A. Seleção de áreas para criação de unidades de conservação na floresta Ombrófila Mista. **Biotemas**, Florianópolis, v.18, p.33-50, 2005.

MELLONI, R.; NOGUEIRA, M.A.; FREIRE, V.F.; CARDOSO, E.J.B.N. Fósforo adicionado e fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e nutrição mineral de limoeiro-cravo [*Citrus limonia* (L.) Osbeck]. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, p. 767-775, 2000.

MENDES FILHO, P.F.; VASCONCELLOS, R.L.F.; PAULA, A.M.; CARDOSO, E.J.B. N. Evaluating the potential of forest species under microbial management for the restoration of degraded mining areas. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, 2009. 1 CD-ROM.

MIYAUCHI, M.Y.H.; LIMA, D. S.; NOGUEIRA, M.A. ; LOVATO, G.M.; MURATE, L. S.; CRUZ, M.F.; FERREIRA, J.M.; ZANGARO, W.; ANDRADE, G. Interactions between diazotrophic bacteria and mycorrhizal fungus in maize genotypes. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, p. 525-531, 2008.

MOREIRA, F.M. de S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2nd ed. Lavras:Ufla, 2006. 729p.

MOREIRA, M.; BARETTA, D.; TSAI, S.M. ;CARDOSO, E.J. B.N. Spore density and root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in preserved or disturbed *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze ecosystems. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 4, p. 380-385, 2006.

MOREIRA, M.; BARETTA, D.; TSAI, S.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Arbuscular mycorrhizal fungal communities in native and in replanted *Araucaria* forest. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, p. 677-684, 2009.

MOREIRA, M.; BARETTA, D.; TSAI, S. M.; GOMES DA COSTA, S.M.; CARDOSO, E.J. B.N. Biodiversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in araucaria forest. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, p. 393-399, 2007a.

MOREIRA, M.; NOGUEIRA, M.A.; TSAI, S.M.; GOMES DA COSTA, S.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Sporulation and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Brazil Pine in the field and in the greenhouse. **Mycorrhiza**, New York, v. 17, p. 519-526, 2007b.

MOREIRA-SOUZA, M.; CARDOSO, E.J.B.N. Dependência micorrízica de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. sob doses de fósforo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.26, p.905-912, 2002.

MOREIRA-SOUZA, M.; CARDOSO, E.J.B.N. Practical method for germination of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. Seeds. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 2, p.389-391, abr. 2003.

MOREIRA-SOUZA, M.; TRUFEM, S.F.B.; GOMES-DA-COSTA, S.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Araucaria angustifolia* (Bert.) O.Ktze. **Mycorrhiza**, New York, 13, n. 4, p.211-215, 2003.

MORTENSON, L.E.; THORNELEY, R.N.F. Structure and function of nitrogenase. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 48, p. 387-418, 1979.

MORTIMER, P.E.; PEREZ-FERNANDEZ, M.A.; VALENTINE, A.J. The role of arbuscular mycorrhizal colonization in the carbon and nutrient economy of the tripartite symbiosis with nodulated *Phaseolus vulgaris*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p.1019-1027, 2008.

MOSSE, B. The regular germination of resting spores and some observations on the growth requirements of an *Endogone* sp. causing vesicular-arbuscular mycorrhiza. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 42, p. 273–286, 1959.

NERONI, R.F. **Diversidade de bactérias diazotróficas associadas à *Araucaria angustifolia* no Estado de São Paulo**. 2007. 60 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

NERONI, R.F.; CARDOSO, E.J.B.N. Occurrence of diazotrophic bacteria in *Araucaria angustifolia*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, p. 303-304, 2007.

NOGUEIRA, M.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Plant growth and phosphorus uptake in mycorrhizal rangpur lime seedlings under different levels of phosphorus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 1, p. 93-99, 2006.

NOGUEIRA, M. A. ; NEHLS, U. ; HAMPP, R. ; PORALLA, K. ; CARDOSO, E.J.B.N. Mycorrhiza and soil bacteria influence extractable iron and manganese in soil and uptake by soybean. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 298, p. 273-284, 2007.

OLIVEIRA, B. de. As regiões de ocorrências normal da araucária. **Anuário Brasileiro de Economia Florestal**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 185-199, 1948.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.242, p.205-215, 2002.

ORTIZ-CEBALLOS, A.; PEÑA-CABRIALES, J.; FRAGOSO, C.; BROWN, G. Mycorrhizal colonization and nitrogen uptake by maize: combined effect of tropical earthworms and velvetbean mulch. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 44, p. 181–186, 2007.

PACOVSKY, R.S.; BETHLENFALVAY, G.J.; PAUL, E.A. Comparison between P-fertilized and mycorrhizal plants. **Crop Science**, Madison, v.26, p. 151-156, 1986.

PATRÓN, J. C.; SÁNCHEZ, P.; BROWN, G. G. ; BROSSARD, M.; BAROIS, I.; GUTIÉRREZ, C. Phosphorus in soil and plants as affected by the geophagous earthworm *Pontoscolex corethrurus* and P fertilization.. **Pedobiologia**, Jena, v. 43, p. 547-556, 1999.

PATTINSON, G.S.; SMITH, S.E.; DOUBE, B.M. Earthworm *Aporrectodea trapezoides* had no effect on the dispersal of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus intraradices*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.1079-1088, 1997.

PENG, S.; EISSENSTAT, D.M.; GRAHAM, J.H.; WILLIAMS, K. Growth depression in mycorrhizal citrus at high phosphorus supply: analysis of carbon costs. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, p. 1063-1071, 1993.

PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection, **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.55, p. 158-161, 1970.

PUPPI, G.; AZCÓN, R.; HÖFLICH, G. Management of positive interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with essential groups of soil microorganisms. In: GIANINAZZI, S.; SCHÜEPP, H. (Ed.). **Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems**. Basel: Birkhäuser-Verlag, 1994. p. 201–215.

RABATIN, S.C.; STINNER, B.R. Indirect effects of interactions between VA mycorrhizal fungi and soil-inhabiting invertebrates on plant processes. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 24, p. 135-146, 1988.

RABATIN, S.C.; STINNER, B.R.; The significance of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal-soil macroinvertebrate interactions in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 27, p. 195-204, 1989.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agronômico, 2001. 285p.

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

RAMBELLI, A. The rhizosphere of mycorrhizae. In: MARKS, G.C.; KOZLOWSKI, T.T. (Ed.). **Ectomycorrhizae, their ecology and physiology**. New York: Academic Press, 1973. p. 299–349.

RAMBO, B. **A Fisionomia do Rio Grande do Sul**: Ensaio de Monografia Natural. 3rd ed. São Leopoldo: Editora Unisinos, 2000. 39p.

REDDELL, P.; SPAIN, A.V. Earthworms as vectors of viable propagules of mycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 23, p.767-774, 1991.

REITZ, R.; KLEIN, R. M. **Araucariáceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1966. 62p.

RENNIE, E.M. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (nitrogen-fixing) bacteria in soils. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 27, n. 1, p. 8-14, 1981.

RHEE, J.A. van. A study of the effect of earthworms on orchard productivity. **Pedobiologia**, Jena, v.17, p. 107-121, 1977.

RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.; HIROTA, M. Brazilian Atlantic forest: how much is left and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, Oxford, v. 142, p. 1141-1153, 2009.

RILLIG, M.C. Arbuscular mycorrhizae, glomalin and soil aggregation. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v.84, p.355-363, 2004.

RIZZINI, C.T. **Tratado de fitogeografia do Brasil**, 2nd ed. Rio de Janeiro: Ambito Cultural Edições, 1997. 747p.

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

SANTOS, A.F. **Efeito da atividade do Oligochaeta *Amyntas* spp. (minhoca louca), na produção do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* - FT 120) e da aveia preta (*Avena strigosa* var *Canton*), com relação a algumas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo**. 1995. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1998.

SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopatológica**, Jaguariúna, v.1, n.3, p.231-233, 1975.

SAS INSTITUTE. **SAS**: User's guide: statistics. 6th ed. Cary: Institute, 2002.

SCHEU, S. The role of substrate feeding earthworms (Lumbricidae) for bioturbation in a beechwood soil. **Oecologia**, New York, v. 72, p. 192–196, 1987.

SCHEU, S. Effects of earthworms on plant growth: patterns and perspectives. **Pedobiologia**, Jena, v.47, p.846–856, 2003.

SCHEU, S.; PARKINSON, D. Effects of invasion of an aspen forest (Canada) by *Dendrobaena octaedra* (Lumbricidae) on plant growth. **Ecology**, Washington, v.75, p. 2348-2361, 1994

SCHÜßLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: Phylogeny and evolution. **Mycological Research**, New York, v. 105, p. 1413-1421, 2001.

SECILIA, J.; BAGYARAJ, D.J. Bacteria and actinomycetes associated with pot cultures of vesicular arbuscular mycorrhizas. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 33, p. 1069–1073, 1987.

SHAW, C.; PAWLUK, S. Faecal microbiology of *Octolasion tyrtaeum*, *Aporrectodea turgida* and *Lumbricus terrestris* and its relation to carbon budgets of three artificial soils. **Pedobiologia**, Jena, v. 29, p. 377–389, 1986.

SHIPITALO, M.J.; LE BAYON, R.C. Quantifying the effects of earthworms on soil aggregation and porosity. In: EDWARDS, C.A. (Ed.). **Earthworm ecology**. Boca Raton :CRC Press, 2004. p.183-200.

SIKES, B.A.; COTTENIE, K.; KLIRONOMOS, J.N. Plant and fungal identity determines pathogen protection of plant roots by arbuscular mycorrhizas. **Journal of Ecology**, Malden, v. 97, p. 1274-1281, Nov. 2009.

SILVA, H.D.; BELLOTE, A.F.J.; FERREIRA, C.A.; BOGNOLA, I.A. Recomendação de solos para *Araucaria angustifolia* com base nas suas propriedades físicas e químicas. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 43, p. 61-74, 2001.

SILVA, L.C.R.; ANAND, M.; OLIVEIRA, J.M.; PILLAR, V.D. Past century changes in *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze water use efficiency and growth in forest and grassland ecosystems of southern Brazil: implications for forest expansion. **Global Change Biology**, Malden, v.15, p.2387–2396. 2009.

SILVEIRA, A.P.D. Micorriza. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Ed.) **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 257-282.

SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S.; SILVA, L.R.C.; LOMBARDI, M.L.C.O. ; CARDOSO, E.J.B.N. Interações de micorrizas arbusculares e rizobactérias promotoras do crescimento de plantas em feijão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 19, p. 205-211, 1995.

SIMÕES, J.W.; COUTO, H.T.Z. Efeitos da omissão na alimentação do pinheiro do Paraná (*Araucária angustifolia*) (Bert.) O. Ktze cultivado em vaso. **IPEF**. Piracicaba, v. 4, n. 7, p. 3-40, 1973.

SIQUEIRA, J.O. **Nutritional and edaphic factors affecting spore germination, germ tube growth and root colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi**. 1983. 123p. Tese (Doutorado) - University of Florida, Gainesville, 1983.

SMITH, S.E.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.39, p.221-244, 1988.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1997. 605p.

SOARES, R.V. Considerações sobre a regeneração natural da *Araucaria angustifolia*. **Floresta**, Curitiba, v. 10, n. 2, p. 12-18, 1979.

SOARES, C.R.F.S.; SIQUEIRA, J.O. Mycorrhiza and phosphate protection of tropical grass species against heavy metal toxicity in multi-contaminated soil. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 44, p. 833-842, Jul. 2008.

SOLÓRZANO-FILHO, J.A.; KRAUS, J.E. Breve história das matas de araucária. In: INTERNATIONAL CONGRESS AND EXHIBITION ON FORESTS, 5., 1999, Curitiba. **Forest 99**. Rio de Janeiro: Biosfera, 1999. p. 37-40.

SOUZA, M.M.S.R.de. **Ecofisiologia de fungos micorrízicos arbusculares em *Araucaria angustifolia***. 2000. 108 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

STEPHENS, P.M.; DAVOREN, C.W. Effect of the lumbricid earthworm *Aporrectodea trapezoides* on wheat grain yield in the field, in the presence or absence of *Rhizoctonia solani* and *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 28, p. 561-567, 1996.

SYLVIA, D.M.; WILLIAMS, S.E. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stress. In: BETHLENFALVAY, G.J.; LINDERMAN, R.G. (Ed.). **Mycorrhizae in Sustainable Agriculture**. Madison: Soil Science Society of America. 1992. p.101-124.

TAMASLOUKHT, B.; SÉJALON-DELMAS, N.; KLUVER, A.; ROUX, C.; BÉCARD, G.; FRANKEN, P. Root factor induce mitochondrial-related-gene expression and fungal respiration during the developmental switch from a symbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, p.1468-1478, 2003.

TANCK, B.; SANTOS, H.R.; DIONÍSIO, J.A. Influência de diferentes sistemas de uso e manejo do solo sobre a flutuação populacional do Oligochaeta edáfico *Amyntas* spp.. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.24, p.409-415, 2000.

TUFFEN, F.; EASON, W.R.; SCULLION, J. The effect of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi on growth of and ³²P transfer between *Allium porrum* plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 1027-1036, 2002.

VANNETTE, R. L.; HUNTER, M.D. Mycorrhizal fungi as mediators of defence against insect pests in agricultural systems. **Agricultural and Forest Entomology**, Malden, v.11, p. 351-359, Nov. 2009.

VASCONCELLOS, R.L.F. **Actinobactérias da rizosfera de *Araucária angustifolia* com potencial biotecnológico**. 2008. 73 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

VEBLIN T.T.; BURNS B.R.; KITZBERGER T.; LARA A.; VILLALBA R. The ecology of the conifers of southern South America. In: ENRIGHT N.J.; HILL R.S. (Ed.). **Ecology of the Southern Conifers**. Melbourne: Melbourne Univ. Press, 1995. p.120–170.

VIERHEILIG, H.; COUGHLAN, A.P.; WYSS, U.; PICHÉ, Y. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.5004-5007, 1998.

VOGT, K.A.; DAHLGREN, R.; UGOLINI, F.; ZABOWSKI, D.; MOORE E.E.; ZASOSKI, R. Aluminum, Fe, Ca, Mg, K, Mn, Cu, Zn and P in above- and belowground biomass. II. Pools and circulation in a subalpine *Abies amabilis* stand. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 4, p. 295–311, 1987.

VOLPIN, H.; KAPULNIK, Y. Interaction of *Azospirillum* with beneficial soil microorganisms. In: OKON, Y. (Ed.) **Azospirillum/Plant Associations**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 111–118.

WILSON, G.W.T.; HETRICK, B.A.D.; KITT, D.G. Suppression of mycorrhizal growth-response of big bluestem by nonsterile soil. **Mycologia**, Lawrence, v. 80, p. 338–343, 1988.

WOLTERS, V.; STICKAN, W. Resource allocation of beech seedlings (*Fagus sylvatica* L.): relationship to earthworm activity and soil conditions. **Oecologia**, New York, v. 88, p. 125-156, 1991.

WURST, S.; DUGASSA-GOBENA, D.; LANGEL, R.; BONKOWSKI, M.; SCHEU, S. Combined effects of earthworms and vesicular–arbuscular mycorrhizas on plant and aphid performance. **New Phytologist**, Malden, v.163, p. 169–176, 2004.

XAVIER, L.J.C.; GERMIDA, J.J. Selective interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* enhance pea yield and nutrition. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v.37, p.261-267, 2003.

YDROGO, H.F.B. **Effecto de las lombrices de tierra (*Pontoscolex corethrurus*) en las micorrizas vesiculo arbusculares (MVA) en la etapa de crecimiento de araza (*Eugenia stipitata*), achiote (*Bixa orellana*), pijuayo (*Bactris gasipaes*), en suelos ultisoles de Yurimaguas**. 1994. 80p. Tese (Graduação) - Universidad Nacional de San Martin, Tarapoto, Peru, 1994.

YU, X.; CHENG, J.; WONG, M.H. Earthworm mycorrhiza interaction on Cd uptake and growth of ryegrass. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 195-201, 2005.

ZANDAVALLI, R.B.; DILLENBURG, L.R.; SOUZA, P.V.D. Growth responses of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) to inoculation with the mycorrhizal fungus *Glomus clarum*. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 25, p.245- 255, 2004.

ZAREA, M.J.; GHALAVAND, A.; GOLTAPPEH, E.M.; REJALI, F.; ZAMANIYAN, M. Effects of mixed cropping, earthworms (*Pheretima* sp.), and arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus mosseae*) on plant yield, mycorrhizal colonization rate, soil microbial biomass, and nitrogenase activity of free-living rhizosphere bacteria. **Pedobiologia**, Jena, v.52, p.223-235, 2009.

ANEXOS

Anexo A - Adaptação de tela do tipo sombrite na abertura superior dos vasos para evitar a fuga das minhocas

Anexo B - Desdobramento das interações duplas e tripla entre minhoca (M), FMA (F) e bactéria diazotrófica (B) sobre a massa seca da parte aérea de *Araucaria angustifolia* na Época 2 de avaliação

Componentes	DF	SS	Mean Square	F value	Pr > F
Blocos	3	3322,9	107,6	1,63	0,2116
M	1	546,2	546,2	8,29	0,009**
F	1	987,9	987,9	15	0,0009**
B	1	200,7	200,7	3,05	0,0955
M*F	1	0,9	0,9	0,01	0,9057
M*B	1	25,6	25,6	0,39	0,5397
F*B	1	355,7	355,7	5,4	0,0302**
M*F*B	1	351,9	351,9	5,34	0,031**

**Interação significativa ($P < 0,05$)