

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

VANESSA SILVA LIMA

**DEPENDÊNCIA ENTRE PLANTAS E AS BACTÉRIAS FIXADORAS DE
NITROGÊNIO: UMA INTERAÇÃO OBRIGATÓRIA EM *Chamaecrista nictitans*
MOENCH (FABACEAE)**

SANTO ANDRÉ

2022

VANESSA SILVA LIMA

**DEPENDÊNCIA ENTRE PLANTAS E AS BACTÉRIAS FIXADORAS DE
NITROGÊNIO: UMA INTERAÇÃO OBRIGATÓRIA EM *Chamaecrista nictitans*
MOENCH (FABACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Bacharelado de
Ciências Biológicas pelo Centro de
Ciências Naturais e Humanas da
Universidade Federal do ABC, como
requisito para a obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Nogueira.
Coorientadora: Ma. Caroline de Lourdes
Souza Oliveira.

SANTO ANDRÉ,

2022

AGRADECIMENTOS

A Deus e à minha família pelo suporte e apoio durante toda a minha vida acadêmica.

Ao meu professor e orientador Dr. Anselmo Nogueira que sabiamente apontou soluções alternativas para viabilidade deste trabalho quando tudo parecia estar perdido durante o período obscuro da pandemia da Covid-19. Pelo esforço e dedicação com o qual realizou a coleta e o processamento das amostras que serviram como base de dados para este trabalho e por toda paciência, orientação e otimismo que me conduziram durante a execução deste trabalho.

À minha coorientadora Ma. Caroline de Lourdes Souza Oliveira que me acolheu durante o seu mestrado e permaneceu comigo, contribuindo enormemente até a conclusão deste trabalho, sempre paciente e compreensiva e por todo conhecimento e conselhos compartilhados que me ajudaram a chegar até aqui.

As reuniões e a toda equipe do Laboratório Interação Planta-Animal (LIPA) da Universidade Federal do ABC coordenado pelo Prof. Dr. Anselmo Nogueira, que muito contribuíram para o meu amadurecimento e formação científica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Universidade Federal do ABC pelo financiamento e concessão de bolsa de Iniciação Científica deste projeto (processo nº 23006.000301/2019-05).

À Universidade Federal do ABC pelo ensino de excelência e por apoiar a busca por uma ciência de qualidade.

RESUMO

Mutualismos são associações cooperativas que acontecem entre espécies diferentes e que são influenciadas pelo contexto ecológico e ambiental na qual ocorrem. Apesar dos mutualismos serem amplamente difundidos ao longo da árvore da vida, eles variam em relação à dependência dos parceiros. Assim, as espécies podem estabelecer associações mutualistas obrigatórias ou facultativas. Neste trabalho, nós avaliamos o tipo de dependência entre uma espécie de leguminosa do gênero *Chamecrista* e bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Rhizobium* (rizóbios) a fim de investigar a estratégia e o investimento adotados por esta associação. Esperamos que tal interação seja do tipo facultativa, ou seja, que essas plantas sejam capazes de regular sua interação com rizóbios. Para isso, cultivamos experimentalmente em casa de vegetação 180 indivíduos de *Chamaecrista nictitans*, dentre os quais 90 foram inoculados com rizóbio e 90 não foram inoculados com rizóbio. Para avaliar a dependência dessas plantas em relação ao rizóbio, nós avaliamos a sobrevivência, o crescimento, a produção de botões e flores dessas plantas. Além disso, nas plantas inoculadas, nós avaliamos o investimento em nodulação e como esse investimento foi traduzido em termo de biomassa total. De forma geral, nós não corroboramos nossas expectativas iniciais de que as associações seriam facultativas para as plantas. De forma oposta, nós detectamos que tais interações são obrigatórias para as plantas, dado que na ausência das bactérias as plantas tiveram maior frequência de morrer, praticamente interromperam o crescimento e nunca se reproduziram. Além disso, quanto maior o investimento em nodulação, maior é a biomassa seca total dos indivíduos inoculados. Assim, os padrões encontrados no nosso estudo evidenciam o alto grau de dependência de *C. nictitans* às bactérias fixadoras de nitrogênio.

Palavras-chave: interações ecológicas, leguminosas, mutualismo, fixação de nitrogênio, rizóbio.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
3	RESULTADOS.....	11
4	DISCUSSÃO	12
	REFERÊNCIAS	15
	LEGENDAS DAS FIGURAS	17
	FIGURAS	18
	MATERIAL SUPLEMENTAR	21

1 INTRODUÇÃO

Mutualismos são associações interespecíficas nas quais os indivíduos participantes trocam algum tipo de serviço ou recurso e essa troca gera um benefício para ambas as espécies envolvidas (Schemske & Horvitz, 1988). Nessas interações, os parceiros que variam quanto ao grau de dependência deles à associação mutualista, estão relacionados com o êxito em termos de aptidão com que um mutualista pode prosperar na ausência do seu parceiro (Chomicki et al., 2020). Assim, os mutualismos podem ser classificados em obrigatórios ou facultativos. No mutualismo obrigatório, existe uma grande dependência de pelo menos uma das espécies envolvidas, sendo, na maioria das vezes, inviável a sobrevivência ou reprodução dessa espécie sem a presença do parceiro mutualista (Bronstein, 1994). Já no mutualismo facultativo, os indivíduos envolvidos conseguem viver isoladamente um do outro e, geralmente, têm múltiplos parceiros mutualistas potenciais, o que leva a uma maior flexibilidade na troca de parceiros (Bronstein, 1994). Dessa forma, é esperado que fatores que afetem os parceiros mutualistas tenham um efeito mais acentuado nos mutualismos obrigatórios, pois a perda de um parceiro mutualista pode levar à extinção do outro parceiro (Dunn et al., 2009).

Um caso particular de mutualismo que varia de interações obrigatórias a facultativas acontece entre espécies de plantas leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio (e.g., bactérias nitrificantes do gênero *Rhizobium*). Nessas interações, as bactérias se associam às raízes das plantas formando nódulos radiculares capazes de fixar o nitrogênio atmosférico (N_2) e convertê-lo numa forma orgânica, em geral amônia, que a planta utiliza facilmente (Tate, 1995). Assim, as bactérias fornecem os compostos nitrogenados para a planta, enquanto a planta hospedeira fornece carboidratos produzidos via fotossíntese para essas bactérias (Phillips, 1980; Tate, 1995; Dilworth et al., 2008). As plantas família Fabaceae, i.e. leguminosas, possuem dois tipos de estratégias de associação e/ou regulação do mutualismo com bactérias fixadoras de N_2 de acordo com a oferta de nitrogênio do meio circundante e com a necessidade das plantas (Menge & Hedin et al., 2009). Na estratégia obrigatória, as leguminosas não crescem sem a presença das bactérias nitrificantes e possuem uma fixação constante independentemente da disponibilidade de nitrogênio no solo; na estratégia facultativa, porém, as leguminosas conseguem crescer e se reproduzir sem as bactérias fixadoras de nitrogênio e regulam a fixação conforme a disponibilidade de nitrogênio no solo varia, e é a estratégia mais comum em plantas de ambientes tropicais (Menge & Hedin et al., 2009).

As espécies do gênero *Chamaecrista* interagem com bactérias fixadoras de nitrogênio formando nódulos no sistema radicular (Sprent et al., 2017). Tais interações nessas espécies parecem ser do tipo facultativa (Stanton-Geddes & Anderson, 2011), ou seja, essas plantas devem regular a interação de acordo com a disponibilidade de nitrogênio no solo (Sheffer et al., 2015). Porém, ainda não conhecemos o quanto essas plantas investem em nodulação com as bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Rhizobium*. O gênero *Chamaecrista* pertence à família Leguminosae que desempenha um papel importante tanto para economia (e.g., soja e feijão) quanto para ecologia dos ecossistemas nativos brasileiros e mundiais (e.g., simbiose com diferentes espécies de bactérias nitrificantes), e ainda são espécies que ajudam a enriquecer o solo com nitrogênio, o que ressalta a importância de estudar tais interações e suas diferenças entre espécies cultiváveis e nativas de plantas (Ripoche et al., 2021; Sprent et al., 2017). Além disso, visto que a fixação simbiótica de N é capaz de atuar no crescimento das plantas (Batterman et al., 2013), entender qual estratégia de fixação de N as plantas utilizam e quais as consequências para o crescimento e reprodução delas é um passo fundamental para uma melhor compreensão sobre os ambientes em que as plantas estão inseridas.

Neste trabalho, nós investigamos qual a estratégia adotada por uma espécie de leguminosa nativa e amplamente distribuída no Brasil, *Chamaecrista nictitans* (L.) Moench, em relação à simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio. Assim, o objetivo específico desse estudo é investigar o investimento que *C. nictitans* fazem na nodulação com essas bactérias, e qual o papel dessas bactérias na sobrevivência, crescimento e reprodução dessas plantas. Esses aspectos irão descrever de forma indireta o grau de obrigatoriedade da fixação de N₂ dessas interações na perspectiva da planta. Com isso, desejamos avaliar: (1) se a interação entre as plantas e essas bactérias é do tipo facultativa ou obrigatória, (2) qual o investimento dessas plantas na nodulação com as bactérias fixadoras de nitrogênio e (3) como a nodulação interfere na aptidão das plantas (crescimento e reprodução). Esperamos que a relação entre as plantas de *C. nictitans* e as bactérias fixadoras de nitrogênio seja do tipo facultativa. Neste caso, nós esperamos que as plantas sem associação com rizóbios possuam um investimento vegetativo e reprodutivo maior ou igual ao das plantas inoculadas com as bactérias.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Espécie de planta estudada:

Chamaecrista nictitans (L.) Moench (Figura 1) é uma planta herbácea anual da família Fabaceae amplamente distribuída no Brasil. As folhas são alternas e uniformemente pinadas, possuem tricomas tectores na parte axial e se fecham lentamente quando tocadas (Lee, 1989). As flores são amarelas, assimétricas, com inflorescência do tipo racemo com 1-5 flores, tendo o seu período de floração correspondente aos meses de julho a agosto (Lee, 1989). Os frutos são vagens secas, e as sementes são dispersas por explosão quando as vagens se abrem. No sistema radicular, as plantas possuem nódulos (Figura 2) portando bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Rhizobium* (Naisbitt, 1992).

Desenho amostral:

Para investigar o grau de dependência das plantas em relação às bactérias fixadoras de nitrogênio, realizamos um experimento de exclusão das bactérias, criando dois grupos de plantas com e sem a inoculação das bactérias. Esse experimento foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa, nós realizamos a preparação do plantio das sementes em casa de vegetação e a inoculação experimental das bactérias fixadoras em metade dos vasos em que as sementes foram plantadas. Na segunda etapa, também em casa de vegetação, foi realizada a medição dos descritores das plantas logo após a germinação das sementes. Nos primeiros três meses de cultivo das plantas foram realizadas inspeções nas plantas para avaliar a sobrevivência dos indivíduos nos dois tratamentos. Conjuntamente, medidas de crescimento foram realizados ao longo dos meses até as plantas atingirem um ano de idade. Os detalhes de ambas as etapas e do número de plantas utilizadas estão descritos a seguir.

Primeira etapa: preparação das plantas e manipulação dos rizóbios.

Para que possamos entender o grau de dependência das plantas em relação às bactérias, e o quanto as plantas investem em nodulação, inoculamos bactérias do tipo rizóbio logo após o plantio das sementes em uma casa de vegetação climatizada Vander Hooven (laboratório multiusuário da Universidade Federal do ABC). Na casa de vegetação, nós cultivamos 180 plantas sob dois tratamentos distintos: plantas com rizóbio (90 plantas inoculadas com essas bactérias – plantas controle) e plantas sem rizóbio (90

plantas manipuladas evitando o contato das sementes e plantas com essas bactérias). Usamos indivíduos oriundos de sementes vindas de uma população de 15 plantas-mãe distintas da espécie estudada que ocorre naturalmente dentro do campus da Universidade Federal do ABC (UFABC) em São Bernardo do Campo.

Para o plantio das sementes, em dezembro de 2019, preparamos 180 vasos que foram esterilizados com álcool 70%, água sanitária e água oxigenada a fim de evitar que houvesse qualquer tipo de contaminação bacteriana que pudesse afetar o experimento. As sementes também foram esterilizadas com álcool 70%, água sanitária e água oxigenada (Somasegaran e Hoben, 1994), lavadas em seguida com água destilada e escarificadas (i.e., foram abrasadas sobre uma superfície áspera com o intuito de quebrar a dormência mecânica primária). Logo após a escarificação das sementes, elas foram distribuídas com cuidado nos vasos para o plantio. Em cada vaso, foram plantadas três sementes sempre da mesma planta-mãe, e foram distribuídas sementes das 15 plantas-mãe igualmente nos dois tratamentos experimentais. O substrato para o plantio foi composto de 70% areia e 30% de terra vegetal homogeneizados previamente, simulando a estrutura física do solo em que as populações de *C. nictitans* são comumente encontradas. O substrato, assim como a argila expandida utilizada no fundo dos vasos, foi esterilizado em autoclave antes da montagem dos vasos e plantio das sementes.

Para o tratamento com rizóbio, inoculamos as bactérias nitrificantes em cada vaso logo após o plantio das sementes. Nós aplicamos 100 mL de solução aquosa composta de água destilada e um macerado de nódulos radiculares frescos com bactérias oriundos do sistema radicular de plantas adultas da espécie. A solução com rizóbios foi aplicada no solo sobre a área em que as sementes estavam plantadas. Adicionalmente, a aplicação da solução com as bactérias foi repetida uma semana depois do plantio nas plantas no tratamento com rizóbio. Para as plantas no tratamento sem rizóbio, as sementes plantadas receberam 100 mL de água destilada nos dois momentos distintos.

Após algumas semanas depois da germinação das sementes, realizamos a aplicação de nutrientes de solo e foliares N-P-K (10-10-10 – marca: Super Verde). Fizemos isso para garantir que todo o potencial de fixação de N_2 da simbiose entre leguminosas e rizóbio não fosse limitado devido à deficiência de nutrientes (Howieson & Dilworth, 2016).

Adicionalmente, nós aplicamos um fungicida (marca: Forth) nas folhas das plantas para controlar possíveis pragas. Os suplementos de nutrientes e o fungicida foram aplicados de forma alternada de 21 em 21 dias nos quatro primeiros meses após o plantio.

Segunda etapa: medição dos descritores de aptidão da planta.

Nós realizamos a amostragem dos descritores das plantas em dois momentos. Nos primeiros três meses, nós realizamos censos nas plantas para avaliar a mortalidade dos indivíduos nos vasos no primeiro momento de vida das plantas. Essa avaliação foi realizada nos 180 vasos. Após esse período, devido à alta taxa de mortalidade das plantas não inoculadas, foram realizadas amostragens mensais detalhadas do crescimento e reprodução em um subconjunto de 20 plantas saudáveis provenientes das mesmas matrizes (10 plantas de cada tratamento) ao longo dos 12 meses de vida das plantas.

Nós avaliamos a aptidão das plantas ao longo do tempo expressa pelo crescimento vegetativo dos indivíduos (número de folhas e altura) e produção de botões e flores em todos os indivíduos de ambos os tratamentos. Durante todo o período de avaliação das plantas, nós continuamos a esterilizar as bancadas da casa de vegetação que dava suporte aos vasos com água oxigenada e álcool 70% a fim de evitar a contaminação cruzada de bactérias entre plantas com e sem rizóbio.

Após 12 meses de cultivo das plantas, nós sacrificamos as 20 plantas avaliadas nesse período, 10 plantas de cada tratamento. Nessas plantas, nós separamos as folhas, caules, raízes e nódulos radiculares e acondicionamos separadamente essas partes em sacos de papel de diferentes tamanhos. Os nódulos radiculares foram contados inicialmente em todo o sistema radicular (Figura 2; ver material suplementar para maiores detalhes desta etapa) e acondicionados em sacos de papel pequenos. Os materiais acondicionados foram finalmente levados para a estufa a 50 graus Celsius para secagem gradual e quantificação da massa seca de cada uma das partes por planta. As amostras foram mantidas na estufa de dois a quatro dias para secagem completa até atingirem estabilidade na pesagem realizada em seguida em balança analítica.

Análise de dados

Para avaliar o efeito das bactérias do tipo rizóbio sobre a mortalidade das plantas, nós construímos um modelo linear generalizado (GLM, “generalized linear model”) com distribuição quasibinomial. Nesse modelo, nós usamos o fator rizóbio em dois níveis

(presença e ausência das bactérias nitrificantes) como variável preditora e a mortalidade das plantas como a variável resposta.

Para avaliar se a presença das bactérias afeta o crescimento das plantas, nós construímos um LM (“linear model”) com distribuição gaussiana. Neste modelo, o fator rizóbio foi a variável preditora e altura das plantas (cm) foi a variável resposta.

Para avaliar se a presença das bactérias afeta o investimento reprodutivo das plantas, nós construímos um modelo linear generalizado (GLM) com distribuição binomial negativa. Para esse modelo, o fator rizóbio foi a variável preditora e a produção de botões e flores (variável do tipo contagem) foram as variáveis respostas.

Por fim, para avaliar a relação entre o investimento das plantas em nódulos radiculares e a biomassa total seca (g), nós construímos um LM (“linear model”) com distribuição gaussiana. Nesse modelo, a massa seca dos nódulos radiculares (g) foi a variável preditora e a biomassa total seca das plantas (g) foi a variável resposta. A biomassa total seca de cada planta foi a somatória das massas seca das folhas, caule e raízes.

Realizamos a análise visual gráfica e a verificação da existência de sobre dispersão dos resíduos em todos os modelos. Nos modelos lineares gaussianos também verificamos graficamente a homogeneidade de variâncias e a normalidade dos resíduos. Realizamos todas as análises com o programa R versão 4.1.2 (R Development Core R Core Team, 2021).

3 RESULTADOS

Nos três primeiros meses de cultivo, a frequência de mortalidade das plantas sem inoculação das bactérias fixadoras de nitrogênio foi duas vezes maior do que das plantas inoculadas com as bactérias (modelo binomial: $n = 15$ matrizes e 180 plantas, $t = -2.5$, $p = 0.019$, Figura 3). Nesse período inicial também foi possível observar diferenças no crescimento e características das plantas entre os dois grupos com e sem inoculação das bactérias fixadoras de nitrogênio (Figura 4). Ao atingirem três meses de idade, as plantas inoculadas com as bactérias nitrificantes já eram maiores, com mais folhas e sem nenhum indicativo de clorose (amarelamento das folhas ocasionado por déficit nutricional), ao contrário das plantas não inoculadas menores, com menos folhas e com clorose evidente (Figura 4).

Aos quatro meses de idade, as plantas inoculadas tinham uma altura sete vezes maior do que as plantas não inoculadas com as bactérias (modelo lognormal: $n = 10$ matrizes e 20 plantas, $t = 3.1$, $p = 0.006$, Figura 5A). Aos 12 meses de idade, as plantas inoculadas tiveram uma altura nove vezes maior do que as plantas não inoculadas com as bactérias (modelo lognormal: $n = 10$ matrizes e 20 plantas, $t = 2.9$, $p = 0.008$, Figura 3A). Em média, as plantas inoculadas tiveram $37,3 \pm 18,69$ cm de altura (média $\pm$ desvio padrão), enquanto as plantas não inoculadas tiveram $4,32 \pm 2,23$ cm de altura após um ano de desenvolvimento. Neste momento também, as plantas inoculadas produziram em sua parte aérea em média $34,95 \pm 33,66$ botões florais e $6,0 \pm 5,78$ flores, enquanto as plantas não inoculadas com as bactérias não produziram flores ou botões florais (modelo binomial negativo: $n = 10$ matrizes e 20 plantas, $F = 22.1$, $p < 0.001$, Figura 5B).

No final do experimento, avaliamos o investimento das plantas em nodulação e quantificamos sua biomassa seca. As plantas não inoculadas nunca produziram nódulos radiculares com as bactérias fixadoras de nitrogênio, decorrente do cuidado que tivemos ao longo de todo experimento para evitar que houvesse qualquer tipo de contaminação nesse grupo de plantas. Já as plantas inoculadas sempre produziram nódulos, embora o investimento em nodulação tenha sido muito variável entre plantas (Figura 6A). Adicionalmente, detectamos uma relação positiva entre a nodulação e a biomassa total das plantas. Neste caso, plantas que apresentaram maior massa seca de nódulos no sistema radicular tiveram uma biomassa seca total acumulada muito maior (modelo normal: $n = 10$ matrizes e 20 plantas, $t = 6.3$, $p < 0.001$, Figura 6B). Em média, a cada 0.1 g investido em nodulação (massa seca), as plantas aumentaram em 3 g sua biomassa total seca.

4 DISCUSSÃO

Muitas espécies de leguminosas estabelecem interações mutualistas com bactérias fixadoras de nitrogênio (Drovat et al., 2020). Nesse tipo de interação, o grau de dependência entre as espécies parceiras é variável. Nos extremos desse gradiente, podemos ter espécies de plantas que estabelecem interações mutualistas obrigatórias, altamente dependentes das bactérias para sobreviverem e se reproduzirem, e aquelas plantas que estabelecem interações facultativas, pouco ou nada dependentes das bactérias para seu desenvolvimento. Assim, nosso estudo investigou a dependência dos indivíduos da leguminosa *Chamaecrista nictitans* em relação ao mutualismo com bactérias fixadoras de nitrogênio, e como essa dependência se traduz na aptidão das plantas. Nossos

resultados não corroboram nossas hipóteses de que *C. nictitans* não é dependente da associação com os rizóbios, formando uma interação facultativa com as bactérias fixadoras de nitrogênio. De forma contrária, nossos resultados mostram que *C. nictitans* é uma espécie altamente dependente da associação com os rizóbios, formando uma interação do tipo obrigatória com as bactérias fixadoras de nitrogênio. Nós encontramos que os indivíduos de *C. nictitans* não inoculados com rizóbio tiveram maior mortalidade, e quando sobreviveram tornaram-se plantas com menor crescimento e não produziram botões e flores. Já os indivíduos inoculados com rizóbio tiveram uma mortalidade muito menor, cresceram muito mais e se reproduziram. Assim, os padrões encontrados no nosso estudo mostram que essa é uma interação obrigatória para essa espécie de *Chamaecrista*, pois sem a associação com as bactérias as plantas não são capazes de obter o nitrogênio do solo. Com isso, as plantas passam a sofrer um déficit nutricional e não se desenvolvem, aumentando suas chances de morrerem prematuramente, e nunca se reproduzindo.

As interações entre os parceiros mutualistas devem sistematicamente aumentar a aptidão individual dos parceiros (Boucher et al., 1982), e esse efeito deve ser intensificado nas associações obrigatórias (Chomicki et al., 2020). No nosso estudo, encontramos que *C. nictitans* possui uma interação obrigatória com as bactérias fixadoras de nitrogênio, visto que os indivíduos inoculados foram mais bem sucedidos em termos de sobrevivência e crescimento do que os indivíduos não inoculados. Os rizóbios são considerados promotores de crescimento vegetal e, quando em mutualismo com as plantas, eles são capazes de estimularem o crescimento das plantas de forma direta por meio da fixação de N_2 e pela produção de hormônios vegetais, favorecendo o acúmulo de biomassa das plantas (Pholo et al., 2018). Por exemplo, já se sabe que, durante o processo de nodulação e fixação de N_2 , determinados rizóbios são capazes de produzir algumas auxinas e citocininas que promovem o crescimento das plantas (Hayashi et al., 2014). De forma indireta, os rizóbios atuam no crescimento vegetal por meio do controle biológico contra patógenos e resistência das plantas a estresses abióticos (Mabrouk et al., 2018). Essa vantagem para as plantas em relação à associação com rizóbio é intensificada com o investimento na produção de nódulos. Nós encontramos que, dentre as plantas inoculadas, as que produziram mais nódulos radiculares foram aquelas que tiveram maior biomassa total, ou seja, maior biomassa foliar, do caule e da raiz. A massa seca foliar, por exemplo, é uma característica importante para a interceptação da luz e para o crescimento

das plantas (Lambers & Poorter, 1992). Assim, um maior investimento na produção de nódulos pode favorecer as plantas em termos de um melhor desempenho.

Além de ser vantajoso para os indivíduos de *C. nictitans* em termos de sobrevivência e crescimento, nós encontramos que apenas os indivíduos inoculados produziram botões florais e flores. Alguns estudos mostram que muitas das bactérias nitrificantes são responsáveis por produzir um hormônio vegetal chamado giberilina, o qual é responsável, dentre outras coisas, por aumentar a quantidade de botões florais e de sementes (Dobbelaere et al., 2003). Dessa forma, a presença da associação com rizóbio em indivíduos de *C. nictitans* pode representar vantagens em termos reprodutivos para as plantas, favorecendo a permanência dos indivíduos nos ambientes.

É importante ressaltar que a presença de nitrogênio não foi um fator limitante para as nossas plantas, visto que as suplementamos com nitrogênio. Ao não inocularmos as plantas com rizóbio e ao suplementarmos as plantas com nitrogênio, nós conseguimos testar a adequação das plantas em relação à ausência das bactérias, o que é necessário para avaliarmos a dependência dos parceiros ao mutualismo (Chomicki et al., 2020). Os resultados encontrados no nosso estudo mostram que *C. nictitans* possui uma baixa capacidade de utilizar o nitrogênio disponível no solo e a presença de bactérias fixadoras de nitrogênio parece ser a única forma possível dessas plantas obterem nitrogênio. Do ponto de vista evolutivo, esse resultado pode ser devido ao fato de que os hospedeiros tendem a evoluir uma maior dependência dos seus parceiros mutualistas quando a recompensa da associação é em forma de nutrientes pois os nutrientes podem ser utilizados a cada geração (McCutcheon, McDonald & Moran, 2009). De forma contrária, quando o benefício recebido é em forma de defesa contra patógenos e/ou herbívoros, por exemplo, a dependência da associação tende a ser menor, visto que esses benefícios só serão requeridos em determinados ambientes (Scarborough, Ferrari & Godfray, 2005).

Nosso estudo demonstrou que na presença do rizóbio os indivíduos de *C. nictitans* possuem um melhor desempenho em termos de sobrevivência, crescimento e reprodução do que indivíduos não inoculados. Além disso, os indivíduos inoculados variaram em termos de investimento em nodulação, com plantas que investiram mais na quantidade de nódulos possuindo maior biomassa seca. Nossos resultados mostram que a presença do rizóbio é um fator determinante para a persistência de indivíduos de *Chamecrista nictitans* nos ambientes.

REFERÊNCIAS

- BATTERMAN, S. A., L. *et al.* Key role of symbiotic dinitrogen fixation in tropical forest secondary succession. **Nature**, v. 502, n. 7470, p. 224-227, 2013.
- BOUCHER, D. H., *et al.* The ecology of Mutualism. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 13:315-347. 1982.
- BRONSTEIN, J. L. Our current understanding of mutualism. **The Quarterly Review of Biology**, v. 69, n. 1, p. 31-51, 1994.
- CHOMICKI, Guillaume., *et al.* The Evolution of Mutualistic Dependence. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 51, n. 1, p.409-32. 2020.
- DILWORTH, M. J. *et al.* (Ed.). **Nitrogen-fixing leguminous symbioses**. Springer Science & Business Media, 2008.
- DOBBELAERE, S; VANDERLEYDEN, J; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical reviews in plant sciences**, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.
- DOVRAT, Guy *et al.* The nitrogen economic spectrum of legume stoichiometry and fixation strategy. **New Phytologist**, v. 227, n. 2, p. 365-375, 2020.
- DUNN, R. R. *et al.* Climatic drivers of hemispheric asymmetry in global patterns of ant species richness. **Ecology letters**, v. 12, n. 4, p. 324-333, 2009.
- HAYASHI, S.; GRESSHOFF, P. M.; FERGUSON, B. J. Mechanistic action of gibberellins in legume nodulation. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 56, n. 10, p. 971-978, 2014.
- HOWIESON, J. G.; DILWORTH, M. J. **Working with rhizobia**. Canberra, Australia: Australian centre for international agricultural research, 2016.
- LAMBERS, H. A. N. S.; POORTER, H. Inherent variation in growth rate between higher plants: a search for physiological causes and ecological consequences. In: **Advances in ecological research**. Academic Press, 1992. p. 187-261.
- LEE, T. D. Patterns of fruit and seed production in a Vermont population of *Cassia nictitans* L.(Caesalpiniaceae). **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, p. 15-21, 1989.
- MABROUK, Y. *et al.* Potential of rhizobia in improving nitrogen fixation and yields of legumes. **Symbiosis**, v. 107, n. 73495, 2018.
- MENGE, D. N. L; HEDIN, L. O. Nitrogen fixation in different biogeochemical niches along a 120 000-year chronosequence in New Zealand. **Ecology**, v. 90, n. 8, p. 2190-2201, 2009.

MCCUTCHEON, J. P.; MCDONALD, B. R.; MORAN, N. A. Convergent evolution of metabolic roles in bacterial co-symbionts of insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 36, p. 15394-15399, 2009.

NAISBITT, T.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I. The evolutionary significance of the legume genus *Chamaecrista*, as determined by nodule structure. **New Phytologist**, v. 122, n. 3, p. 487-492, 1992.

PHILLIPS, D. A. Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 31, n. 1, p. 29-49, 1980.

PHOLO, M. *et al.* Cell division and turgor mediate enhanced plant growth in *Arabidopsis* plants treated with the bacterial signalling molecule lumichrome. **Planta**, v. 248, n. 2, p. 477-488, 2018.

RIPOCHE, A. *et al.* Increasing plant diversity promotes ecosystem functions in rainfed rice based short rotations in Malagasy highlands. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 320, p. 107576, 2021.

SCARBOROUGH, C. L.; FERRARI, J.; GODFRAY, H. C. J. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. **Science**, v. 310, n. 5755, p. 1781-1781, 2005.

SCHEMSKE, D. W.; HORVITZ, C. C. Plant-animal interactions and fruit production in a neotropical herb: a path analysis. **Ecology**, v. 69, n. 4, p. 1128-1137, 1988.

SHEFFER, E. *et al.* Biome-scale nitrogen fixation strategies selected by climatic constraints on nitrogen cycle. **Nature Plants**, v. 1, n. 12, p. 1-6, 2015.

SPRENT, Janet I.; ARDLEY, Julie; JAMES, Euan K. Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. **New Phytologist**, v. 215, n. 1, p. 40-56, 2017.

STANTON-GEDDES, J.; ANDERSON, C. G. Does a facultative mutualism limit species range expansion?. **Oecologia**, v. 167, n. 1, p. 149-155, 2011.

TATE, R. L. **Soil Microbiology**. Wiley, 398, 1995.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1 – *Chamaecrista nictitans* adulta.

Figura 2 – Nódulos radiculares nas raízes de *Chamaecrista nictitans*.

Figura 3 – Variação da probabilidade de morte das plantas de *Chamaecrista nictitans* em decorrência da manipulação na inoculação das bactérias fixadoras de nitrogênio durante os primeiros três meses de vida das plantas. Plantas não inoculadas têm maior chance de morrer do que plantas inoculadas.

Figura 4 – Indivíduos de *C. nictitans* com rizóbio (A) e sem rizóbio (B). Todos os indivíduos têm três meses de idade.

Figura 5 – Relação entre o crescimento em altura e produção de flores-botões nas plantas de *C. nictitans* e a inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio. A: Crescimento das plantas em altura em 4 e 12 meses de idade das plantas. B: Produção de botões florais e flores depois de 12 meses de cultivo (contagem em um dado momento do tempo: fotografia reprodutiva das plantas).

Figura 6 – Variação do número de nódulos radiculares entre plantas inoculadas e não inoculadas de *C. nictitans*, e suas relação com a biomassa total das plantas. A: Número de nódulos entre os dois tratamentos, as plantas não inoculadas não formaram nódulos. B: Relação positiva entre a biomassa total seca das plantas, incluindo a massa seca das raízes, e a nodulação das plantas representada pela biomassa seca do conjunto de nódulos produzidos em cada planta.

FIGURAS

Figura 1



Figura 2



Figura 3

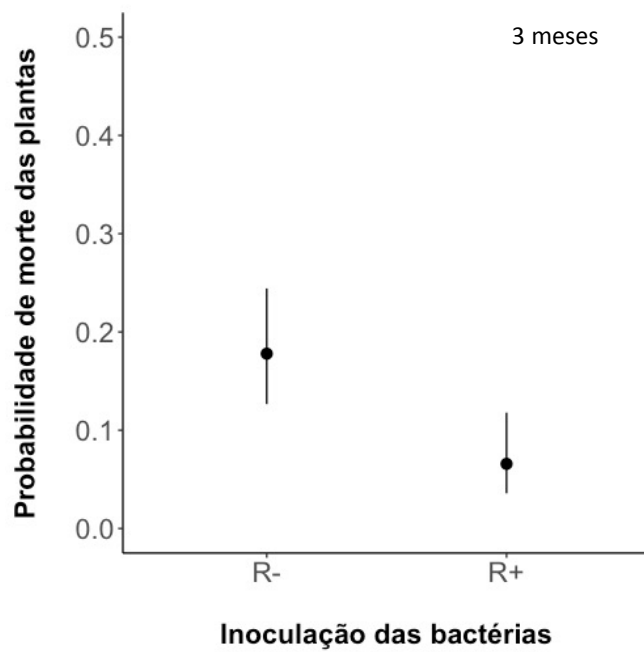


Figura 4



Figura 5

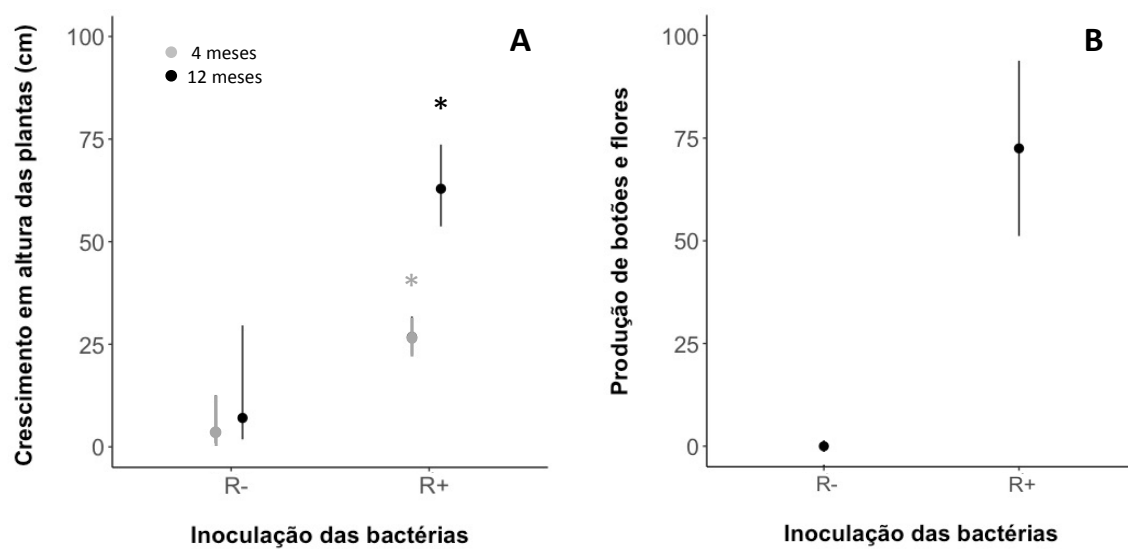
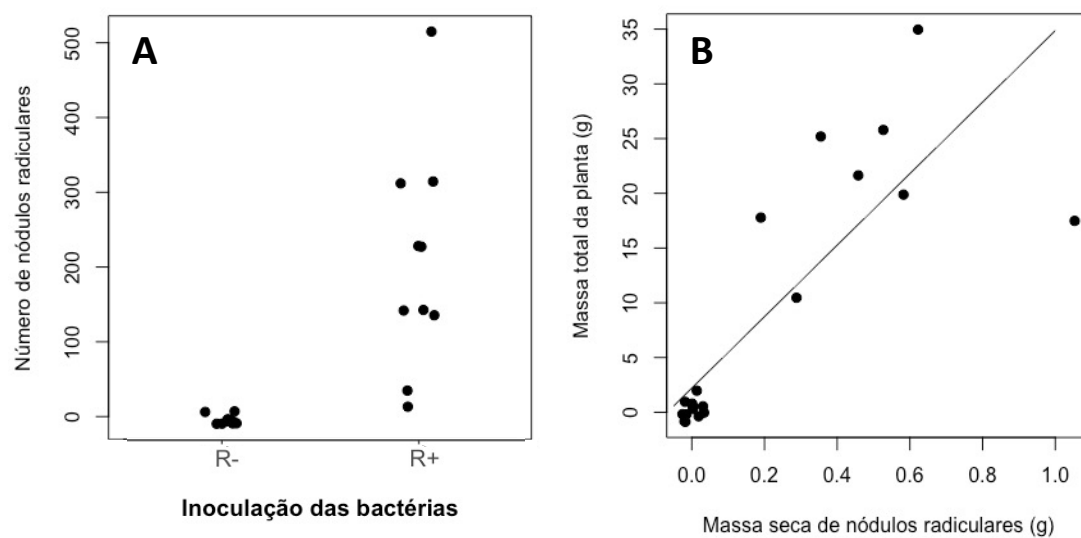


Figura 6



MATERIAL SUPLEMENTAR

Protocolo para coleta de rizóbios

Este protocolo de coleta de rizóbios foi concebido pelo nosso grupo de pesquisa. Após vários pilotos de coleta de rizóbios, o protocolo a seguir foi o mais apropriado para que evitássemos a perda de material e para que coletássemos em menor tempo.

Materiais utilizados:

- 1 recipiente plástico de 10 L para armazenar o material coletado;
- 2 bacias quadradas de 10 L;
- 2 bacias redondas de 80 L;
- 2 baldes de 30 L;
- 3 pinças;
- 1 alicate de poda;
- 4 peneiras de garimpo com diferentes aberturas de malhas;
- água para lavar os rizóbios.

Metodologia:

Primeiro passo: retirar a terra junto com a raiz do vaso

Nesta etapa, primeiramente cortamos a parte aérea da planta com um alicate de poda, em seguida colocamos o vaso na posição horizontal dentro de uma bacia quadrada de 10 L e começamos a molhar a terra com o auxílio de uma mangueira para desprender a terra dentro do vaso. Após a bacia ter se enchido com a água da terra, fizemos pequenas pressões ao redor do vaso (Figura 1A) até que a terra se soltasse dele (Figura 1B).



Figura 1: (A) Pequenas pressões sendo realizadas ao redor do vaso para soltar a terra. (B) Terra se desprendendo do vaso.

Segundo passo: retirada da raiz.

Após a terra ter se desprendido do vaso, dissolvemos a terra cuidadosamente na água para não danificar a raiz da planta. Em seguida, fizemos a retirada da raiz e armazenamos num recipiente separado, aproveitamos também para remover as argilas expandidas que compunham o substrato do vaso (Figura 3).



Figura 3: Remoção das argilas expandidas.

Terceiro passo: passando pela primeira triagem.

Depois de retirar a raiz e as argilas expandidas, com o auxílio de um pote pegamos a terra misturada com a água da bacia de 10 L e passamos em uma peneira de malha média. O material retido contendo os rizóbios foi lavado em água limpa (Figura 4A), separado e armazenado em um recipiente de plástico de 10 L (Figuras 4B e 4C).

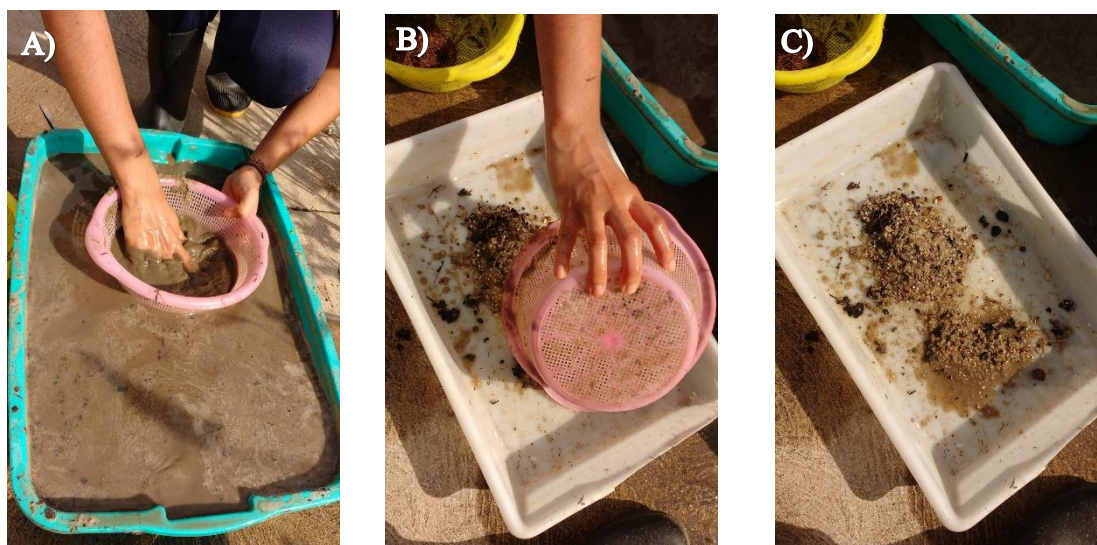


Figura 4: (A) Material sendo lavado. (B) separação do material peneirado. (C) material separado.

Quarto passo: passando pela segunda triagem.

A água da primeira lavagem juntamente com a água que fora utilizada para desprender a terra do vaso na primeira etapa foram peneirados novamente com o auxílio de um pote em uma bacia de 80 L, porém por uma peneira de malha menor do que a utilizada na etapa anterior. O material retido com os rizóbios foi lavado com água limpa (Figura 5). Após a lavagem, o material foi armazenado junto com o material retido da primeira triagem como mostrado na figura 4C.



Figura 5: Material sendo filtrado pela segunda vez por uma peneira de malha menor do que a utilizada na primeira triagem.

Quinto passo: passando pela terceira triagem

Semelhante ao passo anterior, a água da segunda lavagem foi peneirada juntamente com a água do substrato de terra do vaso por uma peneira de malha ainda menor do que a da etapa anterior. Nesse passo foi utilizado um balde ao invés de uma bacia de 30 L (Figura 8). O material retido com os rizóbios na peneira também foi apartado junto com o material das triagens anteriores como ilustrado na figura 4C.



Figura 8: Material sendo peneirado pela terceira vez.

Sexto passo: passando pela última triagem

Na última triagem, o conteúdo do balde foi peneirado por uma peneira de malha bem pequena, o material retido na peneira foi lavado (Figuras 9A e 9B) e armazenado

com o material coletado das triagens anteriores como mostrado na figura 4C. Nesse passo tanto a água peneirada com o substrato de terra quanto a água utilizada na lavagem foram descartadas por não conterem mais rizóbios.

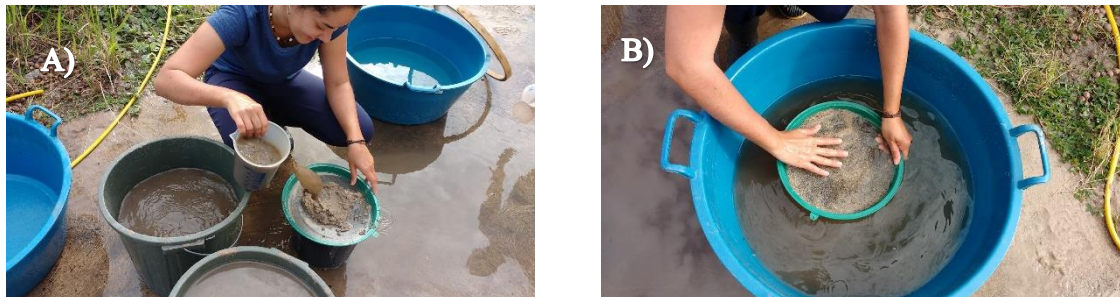


Figura 9: (A) Material passando pela última triagem. (B) Material sendo lavado pela última vez para remover os grânulos de areia.

Sétimo passo: análise do material e coleta dos rizóbios

Terminadas as etapas de triagem, todo o material coletado foi analisado manualmente para a separação dos rizóbios (figura 10).



Figura 10: Separação e coleta dos rizóbios para posterior contagem.