

# INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E FUNGOS MICORRÍZICO-ARBUSCULARES NA CULTURA DA MANDIOCA<sup>1</sup>

ELCIO LIBORIO BALOTA<sup>2</sup>, ELI SIDNEY LOPES<sup>3</sup>, MARIANGELA HUNGRIA<sup>4</sup> e JOHANNA DÖBEREINER<sup>5</sup>

RESUMO - A versatilidade da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em adaptar-se a solos de baixa fertilidade, apesar de possuir alto requerimento de nutrientes, tem sido relacionada à ocorrência de associações com os fungos micorrízico-arbusculares (FMA) e a bactérias diazotróficas. Visando avaliar o efeito da inoculação dos FMA e das bactérias diazotróficas, foi conduzido um experimento com plântulas micropropagadas em vasos de 3,5 litros de volume, com solo arenoso desinfestado como substrato. A inoculação das bactérias diazotróficas não apresentou efeito estimulatório, ao passo que inoculações dos FMA isoladamente e em conjunto com bactéria incrementaram todos os parâmetros de crescimento e nutricionais. A inoculação dos FMA, com a Bactéria E, aumentou a parte aérea e as raízes em até 50% e 105%, respectivamente, em relação à inoculação exclusiva com FMA. Efeitos sinérgicos também foram observados no acúmulo de N da parte aérea e das raízes com aumento de até 88% e 173% e no de fósforo em até 83% e 158%, respectivamente. A co-inoculação da Bactéria E com *Glomus clarum* também aumentou a colonização micorrízica em 40% e a esporulação em 168%, comparada à inoculação do fungo isolado. Estes efeitos benéficos podem ocorrer tanto pela maior absorção de nutrientes pela planta, como pelo estímulo na colonização dos fungos MA.

Termos para indexação: *Manihot esculenta*, absorção de nutrientes, *Glomus manihotis*, *Glomus clarum*, *Klebsiella*, *Azospirillum lipoferum*.

## INOCULATION OF DIAZOTROPHIC BACTERIA AND ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI ON THE CASSAVA CROP

ABSTRACT - The versatility of the cassava crop (*Manihot esculenta* Crantz) to adapt to low fertility soils, although plants require high levels of nutrients, has been related to the occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi (AM) and diazotrophic bacteria. One experiment was then performed with micropropagated plants, to evaluate the effects of AM fungi and diazotrophic bacteria on cassava growth and nutrition. The experiment was performed in pots of 3.5 L capacity, with sandy disinfected soil as substrate. Inoculation with diazotrophic bacteria did not show any statistically significant positive effect, while the inoculation with AM fungi and co-inoculation of AM fungi and bacteria favored growth and nutritional parameters. Co-inoculation of AM fungi and Bacterium E increased shoot and root dry weight up to 50% and 105%, respectively, in relation to the bacterium alone. Synergistic effects were also observed in the nutrient content, increasing shoot and root N up to 88% and 173%, and P content up to 83% and 158%, respectively. Co-inoculation of Bacterium E with *Glomus clarum* also increased mycorrhizal colonization by 40% and sporulation up to 168%, in comparison to the fungi alone. These beneficial effects suggest that the stimulus could be both by the increase in plant nutrient uptake as well as by the stimulation of colonization by MA fungi.

Index terms: *Manihot esculenta*, nutrient uptake, *Glomus manihotis*, *Glomus clarum*, *Klebsiella*, *Azospirillum lipoferum*.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 18 de fevereiro de 1997.

Extraído da Tese de Doutorado do primeiro autor apresentada ao Departamento de Solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

<sup>2</sup> Biólogo, Ph.D., Instituto Agronômico do Paraná-IAPAR, Caixa Postal 481, CEP 86001-970 Londrina, PR. Bolsista do CNPq.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Ph.D., Instituto Agronômico de Campinas, Caixa Postal 28, CEP 13001-970 Campinas, SP. Bolsista do CNPq.

<sup>4</sup> Eng<sup>a</sup>. Agr<sup>a</sup>., Ph.D., Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Caixa Postal 1061, CEP 86001-970 Londrina, PR. Bolsista do CNPq.

<sup>5</sup> Eng<sup>a</sup>. Agr<sup>a</sup>., Ph.D., Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB), Caixa Postal 74505, CEP 23851-970 Seropédica, RJ. Bolsista do CNPq.

## INTRODUÇÃO

A cultura da mandioca pode desenvolver-se satisfatoriamente, com produções razoáveis, em variadas condições de clima e fertilidade de solos; é considerada uma das culturas mais eficientes na produção de carboidratos entre as plantas superiores (Howeler, 1981a).

Em condições de solução nutritiva, a cultura apresenta baixo nível de absorção de N, P e K, com sistema radicular bastante grosso e com poucos pêlos radiculares aparentando, assim, não ser eficiente na absorção de nutrientes. Evidências do alto requerimento de P para o máximo crescimento, em solução nutritiva, foram obtidos por Edwards et al. (1977), onde a mandioca apresentou maior exigência (50 a 127  $\mu\text{mol/litro}$ ) que o milho ou soja (0,7 a 3,0  $\mu\text{mol/litro}$ ) e por Howeler et al. (1982a) que observaram que a mandioca requer maior concentração externa de P (10  $\mu\text{mol}$ ) que o arroz, o milho e o feijão (1  $\mu\text{mol}$ ).

Resultados obtidos sob as mais variadas condições mostraram que a cultura da mandioca extrai de 1,93 a 10,96 kg de N, de 0,56 a 1,89 kg de P e de 4,69 a 9,04 kg de K/tonelada de raízes-tubérculos (Howeler, 1981a). Apesar desta característica de extrair grandes quantidades de nutrientes, principalmente de N e K, e de ser considerada uma cultura que esgota os solos, a mandioca é tradicionalmente cultivada sem a aplicação de fertilizantes (Howeler, 1981a) e não responde, de maneira consistente, à adição de N, mesmo em solos com baixa disponibilidade de nutrientes, como salientado por Gomes (1987), após analisar dezenas de experimentos conduzidos em várias regiões do Brasil.

Para Howeler (1981a, 1981b), esta versatilidade da cultura, com relação à baixa eficiência na absorção de nutrientes em condições de solução nutritiva, e alta absorção em condições de solo, poderia estar associada ao fato de existirem, em condições naturais de solo, associações micorrízicas, além de outras associações entre microrganismos e raízes de plantas. Segundo Howeler et al. (1987), em solos esterilizados com baixa disponibilidade de P, os rendimentos totais de matéria seca e a absorção de P por plantas micorrizadas, são duas a três vezes e sete vezes, respectivamente, maiores do que os de plantas não-micorrizadas. Em solos não esterilizados, estes efeitos continuam, porém não na mesma magnitude. Este efeito, salienta Howeler et al. (1987), evidencia que a mandioca depende muito da associação micorrízica para a absorção eficiente de P, o que confirma resultados obtidos por outros autores (Kang et al., 1980; Howeler et al., 1982a, 1982b; Howeler & Sieverding, 1983; Sieverding & Toro, 1986; Howeler et al., 1987; Kato, 1987).

Howeler et al. (1982b) observaram que o nível crítico, ou seja, o nível de P disponível (Bray II) necessário para a obtenção de 95% do máximo de produção, situou-se em torno de 15 ppm nas plantas micorrizadas, e 190 ppm nas não-micorrizadas. Esta diferença no nível crítico, em função da micorrização, indica que a determinação do nível crítico de P no solo é altamente dependente do grau de infecção micorrízica do sistema radicular.

Estudos de inoculação com outros grupos de microrganismos de solo, particularmente com bactérias diazotróficas se fazem necessários para avaliar seus efeitos na nutrição das plantas, uma vez que foi constatada a ocorrência generalizada de bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum*, *Klebsiella* e uma bactéria denominada, provisoriamente, como Bactéria E, na rizosfera, raízes, tubérculos e manivas da cultura (Balota, 1994; Balota et al., 1994). Isolados da Bactéria tipo E foram obtidos na cultura do arroz (Oliveira, 1992) e da mandioca (Balota, 1994) sendo posteriormente classificados de maneira preliminar como uma nova espécie do gênero *Burkholderia* (Hartmann et al., 1995).

As bactérias diazotróficas parecem representar um componente importante no suprimento de N em diversos ecossistemas. Há muitos anos tem-se verificado que áreas de pastos com gramíneas e cana-de-açúcar têm mantido níveis razoáveis de produtividade sem a aplicação de fertilizantes nitrogenados, o que indica que este fenômeno poderia estar relacionado com a contribuição da fixação biológica de  $\text{N}_2$  (FBN) por microrganismos associativos. Existem inúmeros trabalhos evidenciando os benefícios da inoculação destas bactérias no crescimento e nutrição de várias plantas, particularmente gramíneas (Boddey & Döbereiner, 1988), mas há carência de estudos sobre a cultura da mandioca.

Há relatos de que a interação de fungos MA e bactérias diazotróficas na cultura do tomateiro (El-Raheem et al., 1989) e da batata-doce (Paula, 1992) estimulou a infecção micorrízica e o crescimento e os teores de nutrientes nas plantas. Estes efeitos podem ocorrer pelo incremento na absorção de P pelas plantas micorrizadas, o que daria melhores condições energéticas para o estabelecimento da associação das diazotróficas (Barea & Azcon-Aguilar, 1983). Paula et al. (1991) argumentam que os mecanismos de infecção e colonização da planta hospedeira pelas bactérias diazotróficas poderiam ser mediados pela infecção

micorrízica, uma vez que no processo de penetração das hifas infectivas ocorre maior exsudação de nutrientes e podem acelerar o crescimento das bactérias diazotróficas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas, isoladas da cultura da mandioca, e de fungos micorrízico-arbusculares em plântulas de mandioca micropropagadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi conduzido, em casa de vegetação, um experimento em vasos de 3,5 litros de volume, utilizando, como substrato, solo arenoso (LVA) desinfestado com brometo de metila. A composição química do solo utilizado no experimento encontra-se na Tabela 1. Foram utilizadas plântulas de mandioca micropropagadas oriundas de culturas de meristemas, da cultivar Vassourinha, catalogada como BGM-006 no Banco de Germoplasma da Embrapa-CNPMP, Cruz das Almas, BA.

Os tratamentos foram instalados num esquema fatorial constando de cinco tratamentos de bactérias diazotróficas (Controle sem bactérias, *Klebsiella* sp. (M-51), Bactéria E (E-30), *Azospirillum lipoferum* (M-33) e mistura das três bactérias) e três de fungos MA (Sem fungo, *Glomus manihotis* e *Glomus clarum*), em quatro repetições. Todas as bactérias foram isoladas da cultura da mandioca (Balota, 1994; Balota et al., 1994).

As bactérias diazotróficas utilizadas foram crescidas em meio extrato de levedura-manitol líquido modificado, com 1 g de manitol, 1 g de malato e 50 mg/litro de extrato de levedura (Balota et al., 1995), sob agitação constante, por 24 horas. Após este período, os inóculos foram padronizados em absorbância (leitura da densidade óptica em 560 nm) mediante a diluição e contagem em câmara de "Neubauer". Foram inoculados 2 mL por frasco onde estava sendo feita a micropropagação das plântulas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), e as plantas foram incubadas por duas semanas, após o que, foram retiradas para aclimação. Após o período de aclimação (três semanas), as plântulas foram transplantadas para os vasos utilizados no experimento. No momento do transplante, foi feita nova inoculação de 2 mL do inóculo, contendo  $10^8$  células por mL. No tratamento sem bactérias, foi colocado o inóculo autoclavado. Nos tratamentos com fungos MA foram inoculados, por vaso, 100 esporos de *Glomus manihotis* ou *G. clarum*, provenientes de vaso de multiplicação cultivado com braquiária.

A colheita do experimento foi realizada 95 dias após sua instalação e foram avaliados os seguintes parâmetros: matéria seca e teor de N e P das raízes e da parte aérea, número de esporos de fungos MA, e porcentagem de raízes colonizadas com fungos micorrízicos. O solo da rizosfera foi homogeneizado e submetido ao peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson, 1963), seguido de centrifugação em solução de sacarose a 40%, a 3000 rpm (1000 g), para separação dos esporos e posterior avaliação do número em placa com anéis concêntricos. Das raízes finas, 500 mg foram clarificadas e coradas, com base no método de Phillips & Hayman (1970), como descrito em Colozzi-Filho & Balota (1994) e a colonização micorrízica foi avaliada pelo método da placa riscada (Giovannetti & Mosse, 1980). Nas análises estatísticas, a variável número de esporos foi transformada para  $\log(x+1)$ , e a colonização micorrízica, para arco seno  $\sqrt{x/100}$ .

**TABELA 1. Análise química do solo (LVA arenoso) utilizado no experimento originalmente e após a correção com calcário<sup>1</sup>.**

Época	pH	Ca	Mg	K	P	MO	V	Al
		---- cmol/kg <sup>-1</sup> de solo ---			µg/g	----- % -----		
Antes da correção	4,5	1,18	1,15	0,17	8,80	1,17	38,63	7,4
Após correção	6,0	2,09	2,11	0,26	9,12	1,37	62,97	0,0

<sup>1</sup> pH: CaCl<sub>2</sub> 0,01M; Ca, Mg, Al: KCl 1 N; K, P: Mehlich; MO: C (Walkley & Black) x 1,74; V: saturação de bases.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Matéria da parte aérea e das raízes secas

Os tratamentos com fungos MA foram superiores aos demais. Foi evidenciado um efeito diferenciado dos FMA, em função da bactéria presente (Tabela 2). Na inoculação isolada de FMA houve incrementos de até 555% na parte aérea, e de 1.979% nas raízes com *G. clarum*. Estas respostas eram esperadas, pelo fato de os teores de P no solo (8 ppm) estarem no limite estabelecido por Howeler et al. (1982b) como crítico (8 a 10 ppm) para o desenvolvimento da cultura da mandioca. O aumento do desenvolvimento da mandioca, causado pelos FMA nos mesmos níveis de P no solo (5 a 7 ppm) já havia sido constatado anteriormente, por Howeler et al. (1982b) e por Kato (1987), com incrementos, respectivamente, de 700% e 600% na parte aérea, e de 127% e 201% nas raízes. Efeitos similares foram observados sob condições de solução nutritiva por Howeler

et al. (1982a). Estes resultados evidenciam a baixa capacidade da mandioca em absorver nutrientes em solos desinfestados. A ineficiência do sistema radicular da mandioca em absorver nutrientes na ausência da associação micorrízica (Yost & Fox, 1979; Howeler et al., 1982a, 1982b), poderia ser atribuída ao fato de a cultura apresentar raízes grossas com pouquíssimos pêlos radiculares.

*G. clarum* foi a espécie que mais estimulou o desenvolvimento das plantas, independentemente da ausência ou presença da espécie de bactéria. Muitos trabalhos têm evidenciado o efeito diferenciado das espécies de fungos MA em promover o desenvolvimento das raízes. Exemplo disso são os trabalhos desenvolvidos por Kato (1987), nos quais a inoculação de *G. clarum* aumentou a produção de raízes em 201%, ao passo que com *E. colombiana* este aumento foi de apenas 10%, e por Sieverding & Toro (1986), para quem os aumentos variaram de 40% a 841%. Isolados da mesma espécie, porém de origem diferente, podem influenciar, de maneira diferenciada, as plantas. Além disso, os isolados eficientes em promover o crescimento da parte aérea nem sempre determinam o mesmo efeito nas raízes, e vice-versa.

A inoculação isolada, de bactérias, não proporcionou diferenças significativas no crescimento das plantas, mas a Bactéria E proporcionou um acréscimo de 21% no desenvolvimento da parte aérea em relação ao controle. Na co-inoculação de bactéria e fungo, todos os tratamentos apresentaram tendência de incrementar o desenvolvimento da parte aérea e das raízes, em relação ao fungo isolado, embora somente os tratamentos da Bactéria E com *G. manihotis* ou *G. clarum* tenham diferido estatisticamente, com incrementos, respectivamente, de 50% e 35% na parte aérea, e de 109% e 48% nas raízes (Tabela 2). Efeitos sinérgicos entre fungo MA e bactéria diazotrófica no crescimento das plantas já haviam sido constatados, anteriormente, em outras culturas, como em tomateiro (Bagyaraj & Menge, 1978), em *Paspalum notatum* (Barea et al., 1983) e em batata-doce, onde Paula (1992) observou que a inoculação conjunta incrementou o desenvolvimento das plantas em até 44% em relação à inoculação do fungo isoladamente.

Os dados totais da influência dos fungos MA e das bactérias diazotróficas evidenciam que *G. clarum* foi a melhor espécie de fungo, com acréscimo na parte aérea e nas raízes, respectivamente, de 40% e 53%, em relação ao *G. manihotis* e de 632% e 3.091%, comparado ao controle sem fungo. Em relação ao efeito das bactérias, a Bactéria E se destacou, com acréscimo de 40% na produção da parte aérea, e 66% nas raízes em relação ao controle sem bactérias (Tabela 2).

O desenvolvimento das plantas está relacionado aos teores de nutrientes e à micorrização, como pode ser observado pelas relações lineares altamente significativas do peso da matéria seca da parte aérea com o peso da matéria seca das raízes ( $r=0,95^{**}$ ); à quantidade acumulada de N e P na parte aérea ( $r=0,90^{**}$  e  $0,85^{**}$ , respectivamente); à colonização micorrízica ( $r=0,90^{**}$ ) e ao número de esporos no solo ( $r=0,94^{**}$ ). O peso da matéria seca das raízes se correlacionou aos teores de P nas raízes ( $r=0,55^{**}$ ); à quantidade acumulada de N e P nas raízes ( $r=0,94^{**}$ ); à colonização micorrízica ( $r=0,87^{**}$ ), e ao número de esporos no solo ( $r=0,92^{**}$ ). Altas correlações lineares do desenvolvimento das plantas com a micorrização já haviam sido observadas anteriormente na cultura do cafeeiro (Colozzi-Filho & Siqueira, 1986), da mandioca (Howeler et al., 1987) e da batata-doce (Paula, 1992). Estes resultados indicam que o efeito benéfico dos FMA no desenvolvimento das plantas é mediado pela absorção de nutrientes do solo, como observado em vários outros estudos com a cultura do cafeeiro (Colozzi-Filho & Siqueira, 1986; Siqueira et al., 1993), da mandioca (Kato, 1987; Howeler et al., 1987), e da batata-doce (Paula, 1992).

**TABELA 2. Matéria da parte aérea e das raízes seca de mandioca micropropagada aos 95 dias em função da inoculação de bactérias diazotróficas e de fungos micorrízico-arbusculares. Médias de quatro repetições<sup>1</sup>.**

Bactéria diazotrófica	Fungo micorrízico-arbuscular			Total
	Sem fungo	<i>G. manihotis</i>	<i>G. clarum</i>	
Parte aérea (g/planta)				
Controle	0,828aC	3,993bB	5,425bA	3,415b
<i>Klebsiella</i> sp.	0,801aC	4,058bB	6,355abA	3,738b
Bactéria E	1,003aC	5,992aB	7,325aA	4,773a
<i>A. lipoferum</i>	0,866aC	4,632bB	6,158abA	3,885b
Mistura	0,753aC	3,527bB	5,843bA	3,374b
Total	0,850C	4,440B	6,221A	
Raízes (mg/planta)				
Controle	49aC	509cB	1019bA	526c

<i>Klebsiella</i> sp.	21aC	732cB	1391aA	715b
Bactéria E	52aC	1065aB	1507aA	875a
<i>A. lipoferum</i>	38aB	852abA	902bA	597bc
Mistura	27aC	696bcB	1084aA	602bc
Total	37C	771B	1181A	

<sup>1</sup> Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### Acúmulo de nitrogênio na parte aérea e nas raízes

Os tratamentos com fungos apresentaram maior acúmulo de N do que os sem fungos, porém não ocorreram diferenças entre a utilização de *G. manihotis* e *G. clarum*, com exceção de quando na presença de *Klebsiella* (Tabela 3).

Com relação à utilização de bactérias diazotróficas, pode ser visualizado que, quando inoculadas isoladamente sem fungos, as bactérias não diferiram entre si, apesar de a Bactéria E ter apresentado aumento de 30% no acúmulo de N na parte aérea, e de 21% nas raízes em comparação ao controle sem bactéria. O mesmo comportamento foi observado quando da inoculação conjunta destas bactérias com *G. clarum*, onde houve incremento de até 55% no acúmulo de N na parte aérea e de 94% nas raízes em relação ao fungo isoladamente. Na inoculação conjunta com *G. manihotis*, as bactérias proporcionaram incrementos de 87% na parte aérea, e de 174% nas raízes em relação ao fungo isolado (Tabela 3).

**TABELA 3. Acúmulo de nitrogênio na parte aérea e nas raízes de mandioca micropropagada aos 95 dias em função da inoculação de bactérias diazotróficas e de fungos micorrízico-arbusculares (MA). Médias de quatro repetições<sup>1</sup>.**

Bactéria diazotrófica	Fungo micorrízico-arbuscular			Total
	Sem fungo	<i>G. manihotis</i>	<i>G. clarum</i>	
Parte aérea (mg/planta)				
Controle	20,95aB	119,79bA	156,78aA	99,17bc
<i>Klebsiella</i> sp.	18,42aC	90,90bB	149,34aA	86,22c
Bactéria E	27,28aB	224,10aA	243,19aA	164,86a
<i>A. lipoferum</i>	20,26aB	225,12aA	185,36aA	143,58a
Mistura	25,75aB	153,42bA	199,25aA	126,14ab
Total	22,53B	162,67A	186,78A	
Raízes (mg/planta)				
Controle	0,85aB	9,57cA	16,61bA	9,01b
<i>Klebsiella</i> sp.	0,30aC	17,86bB	32,27aA	16,81a
Bactéria E	1,03aB	26,20aA	29,69aA	18,97a
<i>A. lipoferum</i>	0,65aB	16,61bcA	14,97bA	10,74b
Mistura	0,49aB	14,76bcA	18,43bA	11,23b
Total	0,66C	17,00B	22,39A	

<sup>1</sup> Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os valores totais de efeitos gerais de fungos MA e bactérias diazotróficas evidenciam que a inoculação de *G. manihotis* e *G. clarum* aumentou, em torno de 800%, o acúmulo de N na parte aérea, comparada ao controle sem fungo, não sendo observadas, porém, diferenças significativas entre os fungos. Nas raízes, *G. clarum* foi o melhor fungo, aumentando o acúmulo de N nas raízes em 32%, em relação ao *G. manihotis* e em 3.200% em relação ao controle sem fungo. Com relação ao efeito de bactérias diazotróficas na parte aérea, a Bactéria E e o *A. lipoferum* diferiram significativamente do controle sem bactéria, com acréscimos de 66% e 45%, enquanto a *Klebsiella* apresentou uma diminuição de 13%, apesar de não ter diferido, estatisticamente, do controle sem bactéria; nas raízes, a Bactéria E e *Klebsiella* foram os melhores tratamentos, tendo aumentado, respectivamente, em 110% e 87% (Tabela 3).

A quantidade acumulada de N na parte aérea apresentou correlação linear com o acúmulo de P na parte aérea (0,95\*\*), acúmulo de N e P nas raízes (0,76\*\* e 0,84\*\*, respectivamente), colonização micorrízica (0,89\*\*) e o número de esporos (0,83\*\*), enquanto a quantidade de N nas raízes correlacionou-se com a quantidade acumulada de P nas raízes (0,94\*\*), com a colonização micorrízica (0,80\*\*), e com o número de esporos (0,82\*\*). Kato (1987) observou correlação linear negativa entre os teores de N e P na parte aérea de mandioca. Isto ocorreu, provavelmente, pelo efeito de diluição de N observado pelo autor no referido trabalho. Esses resultados evidenciam que o nível de micorrização influencia diretamente os níveis de N nas plantas, como observado também por Paula (1992) na cultura da batata-doce.

Kato (1987) constatou diminuição de até 53% nos teores de N na parte aérea e 46% nas raízes de mandioca em decorrência da inoculação de *G. clarum*. Paula (1992), trabalhando com batata-doce, obteve diminuição de até 20% nos teores de N da parte aérea com a inoculação de *G. clarum*, enquanto na inoculação conjunta de fungo MA e bactéria diazotrófica houve incremento de 17%, não tendo ocorrido, porém, aumento no acúmulo de N. Na batata-doce, Paula (1992) não observou diferenças nos teores de N nas raízes com a inoculação isolada de *G. clarum* e com a inoculação conjunta *G. clarum* e *A. diazotrophicus*. Contudo, houve incremento de 70% no acúmulo de N nas raízes na inoculação conjunta, em relação ao *G. clarum* isolado.

Estes incrementos na concentração de N na planta, em função da inoculação de bactérias diazotróficas e/ou fungos MA, podem ser atribuídos à fixação de N<sub>2</sub> pelas bactérias, aos efeitos indiretos mediados pela estimulação da FBN pelas micorrizas, e aos efeitos diretos, como incremento da absorção de compostos nitrogenados do solo através das hifas extra-radicales (Ames et al., 1983; Harley & Smith, 1983). O efeito dos FMA sobre as taxas de fixação de N<sub>2</sub> pode ser exercido através da melhoria da nutrição fosfatada no sistema, pois o processo de fixação requer muita energia, consumindo grande quantidade de ATP. Além disso, as micorrizas podem influenciar a FBN, pela maior absorção de outros elementos, como o ferro e o molibdênio (Hayman, 1983).

Tem-se observado, também, que raízes micorrizadas apresentam incrementos na atividade de determinadas enzimas envolvidas na assimilação de N, como a redutase de nitrato e a glutamina sintetase (Smith et al., 1985). O aumento da atividade da redutase de nitrato, que exige níveis elevados de ATP, parece ser devido à melhor nutrição fosfatada da planta. Em relação à glutamina sintetase, esse aumento pode ter sido causado pela nutrição fosfatada e pelo efeito direto dos FMA nessa enzima, por algum fator ainda não conhecido, pois foi constatado efeito benéfico da micorrização mesmo quando doses de P, que proporcionaram desenvolvimentos similares, foram fornecidas às plantas não micorrizadas. Deve-se acrescentar, ainda, que a glutamina sintetase foi detectada em micélio de fungos micorrízicos e que aumentos na atividade da redutase do nitrato também têm sido obtidos com a inoculação de bactérias diazotróficas (Ferreira et al., 1987).

#### Acúmulo de fósforo na parte aérea e nas raízes

Os tratamentos com fungos apresentaram maior acúmulo de P na parte aérea e nas raízes em relação aos sem fungos. Na parte aérea houve diferenças significativas entre as espécies de fungos quando inoculados conjuntamente a Bactéria E ou *A. lipoferum* com o *G. manihotis*, ao passo que o acúmulo de P nas raízes foi incrementado com a inoculação de *G. clarum* isolado ou conjuntamente com *Klebsiella*, e de *G. manihotis* com *A. lipoferum* (Tabela 4).

**TABELA 4. Acúmulo de fósforo na parte aérea e nas raízes de mandioca micropropagada aos 95 dias em função da inoculação de bactérias diazotróficas e de fungos micorrízico-arbusculares (MA). Médias de quatro repetições<sup>1</sup>.**

Bactéria diazotrófica	Fungo micorrízico-arbuscular			Total
	Sem fungo	<i>G. manihotis</i>	<i>G. clarum</i>	
Parte aérea (mg/planta)				
Controle	1,70aB	14,77bA	15,08aA	10,52bc
<i>Klebsiella</i> sp.	1,44aB	11,36bA	15,25aA	9,35c
Bactéria E	2,14aC	26,96aA	20,66aB	16,59a
<i>A. lipoferum</i>	1,13aC	23,85aA	15,15aB	13,38ab
Mistura	1,04aB	17,11bA	16,13aA	11,43bc
Total	1,49B	18,81A	16,45A	
Raízes (mg/planta)				

Controle	0,10aC	1,66cB	3,26bcA	1,67b
<i>Klebsiella</i> sp.	0,04aC	2,28bcB	4,55aA	2,29ab
Bactéria E	0,11aB	4,28aA	4,40abA	2,93a
<i>A. lipoferum</i>	0,07aC	3,64abA	2,27cB	1,99b
Mistura	0,05aB	3,29abA	2,87cA	2,07b
Total	0,07B	3,03A	3,47A	

<sup>1</sup> Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com relação à inoculação de bactérias diazotróficas, não foram detectadas diferenças entre elas quando inoculadas isoladamente, sem fungo. Entretanto, na presença de fungos, pode-se observar que houve um efeito diferenciado das bactérias. Na inoculação das bactérias com *G. manihotis*, houve diferenças significativas no acúmulo de P na parte aérea, com a Bactéria E e *A. lipoferum* apresentando incrementos de 83% e 61% em relação à presença isolada de *G. manihotis*, enquanto nas raízes a inoculação conjunta com *G. manihotis* a Bactéria E, o *A. lipoferum* e a mistura apresentaram maior acúmulo de P nas raízes, com incrementos de até 158% em relação ao *G. manihotis* isolado, e na inoculação com *G. clarum* a *Klebsiella* foi a única bactéria que se diferenciou dos tratamentos com *G. clarum* isolado (Tabela 4).

Os valores totais de efeito geral da inoculação de fungos MA e bactérias diazotróficas no acúmulo de P na parte aérea e nas raízes mostram que não houve diferença entre *G. manihotis* e *G. clarum*, que apresentaram grande acúmulo de P em relação ao controle sem fungo. Com relação às bactérias diazotróficas, a Bactéria E propiciou maior acúmulo de P na parte aérea (58%) e nas raízes (75%) em relação ao controle sem bactérias (Tabela 4).

Os teores de P na planta estão relacionados com o nível de micorrização, como pode ser observado pelas altas correlações lineares da quantidade acumulada de P na parte aérea com os teores de P na parte aérea (0,80\*\*), pelo acúmulo de P nas raízes (0,86\*\*), pela colonização micorrízica (0,88\*\*) e pelo número de esporos (0,70\*\*). O acúmulo de P nas raízes correlacionou-se com os teores de P nas raízes (0,75\*\*), com a colonização micorrízica (0,85\*\*) e com o número de esporos (0,84\*\*). Siqueira et al. (1993) já haviam observado a correlação da micorrização e os teores de P em mudas de café, e Paula (1992), a relação da micorrização com os teores de P nos tubérculos, na parte aérea e nas raízes de batata-doce. Estes resultados evidenciam que o nível de colonização micorrízica atua diretamente nos níveis de P nas plantas. Para Colozzi-Filho & Siqueira (1986), estes efeitos podem resultar da ação direta do fungo sobre os mecanismos de absorção ou da interação ou diluição dos nutrientes, em decorrência do desenvolvimento diferenciado das plantas. Colozzi-Filho & Siqueira (1986) observaram, ainda, que a relação da colonização micorrízica e seu efeito nos teores de P na parte aérea não é linear. Quando a taxa de colonização foi menor que 10-15%, houve efeito negativo sobre o teor de P, quando situado entre 15-35%, apresentou pequeno efeito positivo; quando superior a 35%, houve efeito acentuado sobre o teor de P na planta.

Em batata-doce, Paula (1992) verificou que a inoculação conjunta de *G. clarum* e *A. diazotrophicus* proporcionou incrementos de 54% na parte aérea e 81% no acúmulo de P nas raízes em relação a *G. clarum* isolado. Os maiores acúmulos de P na parte aérea e nas raízes, encontrados neste trabalho e no de Paula (1992), evidenciam a maior capacidade destas plantas em absorver o P. Este aumento na capacidade de absorção de P pode resultar do fato de os fungos MA desenvolverem grande quantidade de hifas extraradculares, que funcionam como extensões do sistema radicular, aumentando, assim, a área de exploração das raízes nos solos. Além disso, estas hifas absorvem o P além da zona de depleção ao redor das raízes, causada pela baixa mobilidade do nutriente. Tem sido salientado que 1 cm de raízes sem micorrizas pode explorar até 2 cm<sup>3</sup> de solo, mas que com a micorrização ocorre um grande aumento nesta área de exploração, podendo chegar até a 200 cm<sup>3</sup> por cm de raízes colonizadas (Sieverding, 1991).

Existem poucas informações com relação à densidade destas hifas externas no solo. Entretanto, foram observados até 39 m de hifas fúngicas MA por ml de solo numa floresta tropical (Orozco et al., 1986 citado em Sieverding, 1991) e até 12 m de hifas por grama de solo em ecossistema de duna, podendo ser estimado de 12 m a 592 m de hifas de fungos MA por cm de raízes colonizadas (Sylvia, 1986). Têm sido observados, ainda, até dez pontos de infecção com fungo MA por cm de raízes (Ocampo et al., 1980).

O desenvolvimento de micorrizas pode, indiretamente, aumentar a solubilização de P, pois, pela maior quantidade de raízes ocorreria um aumento nos exsudatos radiculares que atuariam diretamente, na solubilização, ou indiretamente, pelo aumento da população de microrganismos solubilizadores.

## Colonização micorrízica e esporulação

As porcentagens da colonização micorrízica (Tabela 5) evidenciam que não houve diferenças entre os valores apresentados por *G. manihotis* e *G. clarum*, independentemente da ausência ou da espécie de bactéria diazotrófica utilizada. Kato (1987) observou a capacidade diferenciada das espécies em colonizar as raízes nos diferentes estádios de desenvolvimento da planta, pois aos 50 dias, *G. clarum* apresentou colonização 121% superior à apresentada por *E. colombiana*, tornando-se praticamente igual aos 90 dias, com uma superioridade de 14%.

**TABELA 5. Colonização micorrízica e esporulação de fungos micorrízico-arbusculares em mandioca micropropagada aos 95 dias em função da inoculação de bactérias diazotróficas e fungos MA. Médias de quatro repetições<sup>1</sup>.**

Bactéria diazotrófica	Colonização micorrízica <sup>2</sup>		Esporulação <sup>3</sup>	
	<i>G. manihotis</i>	<i>G. clarum</i>	<i>G. manihotis</i>	<i>G. clarum</i>
	----- % -----		----- N <sup>o</sup> /100 mL solo -----	
Sem Bactéria	65,09bA	63,84cA	41,78abB	113,56cA
<i>Klebsiella</i> sp.	65,40bA	74,88bcA	26,12bB	178,53bA
Bactéria E	86,87aA	89,76aA	29,95abB	304,44aA
<i>A. lipoferum</i>	81,42abA	85,02abA	62,45aB	177,97bA
Mistura	82,57aA	82,14abA	28,82bB	86,15cA

<sup>1</sup> Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

<sup>2</sup> Na análise estatística os dados foram transformados para arco seno  $\sqrt{x/100}$ .

<sup>3</sup> Na análise estatística os dados foram transformados para log (x+1).

Com relação à inoculação de bactérias diazotróficas, pode ser visualizado que sua presença influenciou a colonização micorrízica. A inoculação conjunta da Bactéria E e da mistura de bactérias com *G. manihotis*, e da Bactéria E com *G. clarum*, aumentaram em até 40% a colonização micorrízica, em relação ao fungo isolado.

O *G. clarum* apresentou maiores números de esporos que *G. manihotis*, independente da ausência ou da espécie de bactéria presente. Contudo, não foram detectadas diferenças em função da inoculação com bactérias diazotróficas. A Bactéria E com *G. clarum* e a bactéria *A. lipoferum* com *G. manihotis* destacaram-se no estímulo da esporulação dos fungos, apresentando incrementos de 50% e 168%, respectivamente, em relação ao fungo isolado, enquanto a inoculação da mistura de bactérias apresentou efeito inibitório na esporulação dos fungos (Tabela 5).

Estes efeitos sinérgicos entre fungo MA e bactéria diazotrófica também foram observados por El-Raheem et al. (1989) na cultura do tomateiro, em que o *Azotobacter chroococcum* estimulou em 108% a colonização de *Glomus* sp. e por Paula (1992), na batata-doce, em que houve aumento de até 61% na colonização micorrízica, e de até 167% na esporulação de *G. clarum*, em função da inoculação conjunta com bactérias diazotróficas.

Foi observada correlação linear altamente significativa entre a colonização micorrízica e a esporulação ( $r=0,94^{**}$ ), como observado anteriormente por Hayman (1970) e Giovannetti (1985). Entretanto, outros autores não evidenciaram esta correlação (Koske & Halvorson, 1981; Balota, 1989; Balota & Lopes, 1996). A maior colonização radicular e esporulação dos fungos MAs no solo parece indicar o envolvimento das bactérias diazotróficas no crescimento das hifas e na esporulação dos fungos (Azcon, 1989; Will & Sylvia, 1990). Estas bactérias diazotróficas podem estimular os fungos diretamente, pelas substâncias que produzem, ou indiretamente, pela indução destas substâncias pelas plantas hospedeiras. Sabe-se, contudo, que muitas substâncias produzidas pelas bactérias, ou exsudadas pelos vegetais, possuem a capacidade de estimular o desenvolvimento do micélio dos fungos e sua bifurcação e, conseqüentemente, sua penetração no hospedeiro, pelo aumento do contato hifa fúngica e célula do hospedeiro (Siqueira, 1991). Esses aumentos auxiliariam o processo de infecção dos fungos MA nas raízes (Meyer & Linderman, 1986; Secilia & Bagyaraj, 1987), resultando, assim, maior taxa de colonização micorrízica (Graham et al., 1981). Assim sendo, essas substâncias atuariam como fatores determinantes do nível de colonização micorrízica. No entanto, essa influência parece ser principalmente qualitativa, e não necessariamente quantitativa (Elias & Safir, 1987),

pois evidências mostram que estes efeitos estimulatórios seriam resultantes principalmente de substâncias indutoras do que, propriamente, de fatores nutricionais (Becard & Piche, 1989; Paula & Siqueira, 1990). Foi constatado, inclusive, que o maior enraizamento das plantas pode proporcionar maior ativação da rizosfera, pela liberação de exsudatos que geralmente pertencem ao grupo dos compostos aromáticos (Siqueira, 1991).

Esses resultados de incrementos no desenvolvimento e na nutrição das plantas de mandioca, graças à inoculação de fungo MA ou de bactéria diazotrófica, assumem grande importância agrônômica, uma vez que a cultura da mandioca é considerada altamente dependente da simbiose micorrízica. Essa dependência explica, pelo menos em parte, o fato de a cultura apresentar raízes morfologicamente com baixa capacidade de absorver nutrientes e exigir altos teores de nutrientes na solução do solo para que haja adequada nutrição, e, por outro lado, sob condições de solo, apresentar alta absorção de nutrientes comparada a outras culturas. Esse paradoxo é justificado, pelo menos em parte, pelos microrganismos do solo (fungos MA e bactérias diazotróficas), que desempenham papel imprescindível para que haja adequada nutrição na cultura, não ocorrendo porém, adequado desenvolvimento das plantas na ausência destes, mesmo com a aplicação de fertilizantes (50 kg de N e 30 kg de P por ha) (Balota & Camacho, 1995). Estes resultados evidenciam, ainda, a complexidade das interações destes microrganismos e a cultura da mandioca, tanto no aspecto nutricional da planta como no estabelecimento ou disseminação do simbionte fúngico. Além disso, outros fatores, tanto bióticos como abióticos, podem aumentar esta complexidade (Balota et al., 1995).

Assim visto, fica bastante clara a importância destes microrganismos na interação com as plantas, bem como nos ecossistemas. Para a manipulação destes microrganismos nos agroecossistemas, é necessário obter maiores conhecimentos da sua ecologia e dinâmica populacional, tendo em vista as condições físicas, químicas, e, principalmente, biológicas, do solo. Há necessidade, portanto, de estudos de ecologia, fisiologia e genética destes grupos de microrganismos, bem como de suas interações com as plantas, pois está bastante claro a influência das substâncias produzidas pelas bactérias e exsudadas pelas plantas, no comportamento da microbiota do solo, sendo cada interação bactéria-fungo-ambiente, bastante específica. Torna-se, assim, imprescindível a busca de maior conhecimento para que as interações da mandioca com os microrganismos do solo possam ser melhor entendidas, e conseqüentemente, melhor manejadas.

## CONCLUSÕES

1. A cultura da mandioca depende dos fungos micorrízico-arbusculares (MA) para o seu desenvolvimento e nutrição nitrogenada e fosfatada.
2. As bactérias diazotróficas apresentam efeito estimulatório apenas na presença dos fungos MA.
3. Há efeitos sinérgicos dos fungos micorrízico-arbusculares e das bactérias diazotróficas.
4. A presença da Bactéria E e de *Azospirillum lipoferum* aumenta a colonização micorrízica e a esporulação dos fungos MA.

## REFERÊNCIAS

- AMES, R.N.; REID, C.P.P.; PORTER, L.K.; CAMBARDELLA, C. Hyphal uptake and transport of nitrogen from two <sup>15</sup>N-labelled sources by *Glomus mosseae*, a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, **New Phytologist**, London, v.95, p.381-396, 1983.
- AZCON, R. Selective interaction between free-living rhizosphere bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.21, p.639-644, 1989.
- BAGYARAJ, D.J.; MENGE, J.A. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and *Azotobacter* and their effects on rhizosphere microflora and plant growth. **New Phytologist**, London, v.80, p.567-573, 1978.
- BALOTA, E.L. **Flutuação sazonal de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares no cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. Piracicaba: USP-ESALQ, 1989. 145p. Dissertação de Mestrado.
- BALOTA, E.L. **Interação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos vesículo-arbusculares na cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Itaguaí: UFRRJ, 1994. 281p. Tese de Doutorado.
- BALOTA, E.L.; CAMACHO, L. Efeito de fungos MA e bactérias diazotróficas na mandioca micropropagada em diferentes níveis de N e P. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S. (Eds.). **Microbiologia do solo: desafios para o século XXI**. Londrina: IAPAR/Embrapa-CNPSo, 1995. p.404-409.
- BALOTA, E.L.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. Occurrence of diazotrophic bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with cassava (*Manihot esculenta* Crantz). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON

- NITROGEN FIXATION WITH NON-LEGUMES, 6., 1993, Ismailia. **Anais...** Ismailia, Egypt: Cairo Univ., 1994. p.53-58.
- BALOTA, E.L.; LOPES, E.S. Introdução de fungo micorrizico arbuscular no cafeeiro em condições de campo. I. Persistência e interação com espécies nativas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.20, p.217-223, 1996.
- BALOTA, E.L.; LOPES, E.S.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. Interações e efeitos fisiológicos de bactérias diazotróficas e fungos micorrizicos arbusculares na mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, n.11, p.1335-1345, nov. 1995.
- BAREA, J.M.; AZCON-AGUILAR, C. Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing. **Advances in Agronomy**, New York, v.36, p.1-54, 1983.
- BAREA, J.M.; BONIS, A.F.; OLIVARES, J. Interactions between *Azospirillum* and VA mycorrhiza and their effects on growth and nutrition of maize and ryegrass. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.15, p.705-709, 1983.
- BECARD, G.; PICHE, Y. Fungal growth stimulation by CO<sub>2</sub> and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.55, p.2320-2325, 1989.
- BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent results and perspectives for future research. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.108, p.53-65, 1988.
- COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L. Micorrizas arbusculares. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S. (Eds.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p.383-418.
- COLOZZI-FILHO, A.; SIQUEIRA, J.O. Micorrizas vesículo-arbusculares em mudas de cafeeiro. I. Efeitos de *Gigaspora margarita* e adubação fosfatada no crescimento e nutrição. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.10, p.199-205, 1986.
- EDWARDS, D.G.; ASHER, C.J.; WILSON, G.L. Mineral nutrition of cassava and adaptation to low fertility conditions. In: SYMPOSIUM OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR TROPICAL ROOT CROPS, 4., 1976, Cali. **Proceedings...** Ottawa, CAN: International Development Research Centre, 1977. p.124-130.
- EL-RAHEEM, A.; EL-SHANSHOURY, R.; HASSAN, M.A.; ABDEL-GHAFFAR, B.A. Synergistic effect of vesicular-arbuscular-mycorrhizas and *Azotobacter chroococcum* on the growth and the nutrient contents of tomato plants. **Phyton**, Austria, v.29, p.203-212, 1989.
- ELIAS, K.S.; SAFIR, G.R. Hyphal elongation of *Glomus fasciculatus* in response to root exudates. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.53, p.1928-1933, 1987.
- FERREIRA, M.C.B.; FERNANDES, M.S.; DÖBEREINER, J. Role of *Azospirillum brasilense* nitrate reductase in nitrate assimilation by wheat plants. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.4, p.47-53, 1987.
- GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decating. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.46, p.235-246, 1963.
- GIOVANNETTI, M. Seasonal variations of vesicular-arbuscular mycorrhizas and *Endogonaceus* spores in a maritime sand dune. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.84, p.679-684, 1985.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, London, v.84, p.489-500, 1980.
- GOMES, J.C. Considerações sobre adubação e calagem para a cultivar da mandioca. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v.6, p.99-107, 1987.
- GRAHAM, J.H.; LEONARD, R.T.; MENGE, J.A. Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhizae formation. **Plant Physiology**, Baltimore, v.68, p.548-552, 1981.
- HARLEY, J.L.; SMITH, S.E. **Mycorrhizal symbiosis**. London: Academic Press, 1983. 483p.
- HARTMANN, A.; BALDANI, J.I.; KIRCHHOF, G.; ABMUS, B.; HUTZLER, P.; SPRINGER, N.; LUDWIG, W.; BALDANI, V.L.; DÖBEREINER, J. Taxonomic and ecologic studies of diazotrophic rhizosphere bacteria using phylogenetic probes. In: FENDRIK, I.; GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; ZAMAROCZY, M. (Eds.). ***Azospirillum* VI and related microorganisms: genetics, physiology, ecology**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.415-427.

- HAYMAN, D.S. *Endogone* spore numbers in soil and vesicular-arbuscular mycorrhiza in wheat as influenced by season and soil treatment. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.54, p.53-63, 1970.
- HAYMAN, D.S. The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.61, p.944-963, 1983.
- HOWELER, R.H. **Nutrición mineral y fertilización de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1981a. 55p.
- HOWELER, R.H. The effect of mycorrhizal on the phosphorus nutrition cassava. In: RUSSEL, R.S.; IGUE, K.; MEHTA, Y.R. (Eds.). **The soil/root system in relation to Brazilian Agriculture**. Londrina: IAPAR, 1981b. p.243-258.
- HOWELER, R.H.; ASHER, C.J.; EDWARDS, D.G. Establishment of an effective endomycorrhizal association on cassava in flowing solution culture and its effects on phosphorus nutrition. **New Phytologist**, London, v.90, p.229-238, 1982a.
- HOWELER, R.H.; CADAVID, L.F.; BURCKHARDT, E. Response of cassava to VA mycorrhizal inoculation and phosphorus application in greenhouse and field experiments. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.69, p.327-339, 1982b.
- HOWELER, R.H.; SIEVERDING, E. Potentials and limitations of mycorrhizal inoculation illustrated by experiments with field-grown cassava. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.75, p.245-261, 1983.
- HOWELER, R.H.; SIEVERDING, E.; SAIF, S.R. Practical aspects of mycorrhizal technology in some tropical crops and pastures. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.100, p.249-283, 1987.
- KANG, B.T.; ISLAM, R.; SANDERS, F.E.; AYNABA, A. Effect of phosphate fertilization and inoculation with VA-mycorrhizal fungi on performance of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) grown on an Alfisol. **Field Crops Research**, Netherlands, v.3, p.84-94, 1980.
- KATO, O.R. **Efeito de micorriza vesicular-arbuscular no crescimento e nutrição da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em solo adubado com doses crescentes de superfosfato triplo**. Lavras: ESAL, 1987. 177p. Dissertação de Mestrado.
- KOSKE, R.E.; HALVORSON, W.L. Ecological studies of vesicular-arbuscular mycorrhizae in a barrier sand dune. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.59, p.1413-1422, 1981.
- MEYER, J.R.; LINDERMAN, R.G. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.18, p.185-190, 1986.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- OCAMPO, J.A.; MARTIN, J.; HAYMAN, D.S. Influence of plant interactions on vesicular-arbuscular mycorrhizal infections. I. Host and non-host plants grown together. **New Phytologist**, London, v.84, p.27-35, 1980.
- OLIVEIRA, E. **Bactérias diazotróficas na cultura de arroz irrigado**. Itaguaí: UFRRJ, 1992. 96p. Dissertação de Mestrado.
- PAULA, M.A. **Interação micorrizas vesículo-arbusculares e bactérias diazotróficas em batata-doce (*Ipomoea batatas* (L) Lam)**. Itaguaí: UFRRJ, 1992. 168p. Tese de Doutorado.
- PAULA, M.A.; REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.) and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.11, p.111-115, 1991.
- PAULA, M.A.; SIQUEIRA, J.O. Stimulation of hyphal growth of the VA mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* by suspension-cultured *Pueraria phaseoloides* cells and cell products. **New Phytologist**, Cambridge, v.115, p.69-75, 1990.
- PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.55, p.158-161, 1970.
- 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.
- SIEVERDING, E. **Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems**. Eschborn: GTZ, 1991. 371p.

- SIEVERDING, E.; TORO, S.T. The genus *Entrophospora* in Colombia. In: GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. (Eds.). **Physiological and genetical aspects of mycorrhizae**. Paris: INRA, 1986. p.621-626.
- SIQUEIRA, J.O. Fisiologia e bioquímica de micorrizas vesículo-arbusculares: alguns aspectos da relação fungo-planta e absorção de fósforo. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 4., 1991, Mendes. **Anais...** Mendes: CNPDS/UFRRJ, 1991. p.105-131.
- SIQUEIRA, J.O.; COLOZZI-FILHO, A.; SAGGIN JÚNIOR, OJ; GUMARÃES, PTG; OLMERA, E. Crescimento de mudas e produção do cafeeiro sob influência de fungos micorrízicos e superfosfato. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.17, p.53-60, 1993.
- SMITH, S.E.; ST. JOHN, B.J.; SMITH, F.A.; NICHOLAS, D.J.D. Activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in *Trifolium subterraneum* L. and *Allium cepa* L.: Effects of mycorrhizal infection and phosphate nutrition. **New Phytologist**, London, v.99, p.211-227, 1985.
- SYLVIA, D.M. Spacial and temporal distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Uniola paniculata* in Florida foredunes. **Mycologia**, New York, v.78, p.728-734, 1986.
- WILL, M.E.; SYLVIA, D.M. Interaction of rhizosphere bacteria, fertilizer, and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with sea oats. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.2073-2079, 1990.
- YOST, R.S.; FOX, R.L. Contribution of mycorrhizae to P nutrition of crops growing on an Oxisol. **Agronomy Journal**, Madison, v.71, p.903-908, 1979.