

**JOSÉ ANTÔNIO RAMOS PEREIRA**

**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM  
DIFERENTES GENÓTIPOS DE MILHO ( *Zea mays* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia,  
área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção  
do título de “Mestre”.

**Orientador**

Prof. ROMILDO DA SILVA

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
1995**

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da  
Biblioteca Central da UFLA

Pereira, José Antônio Ramos

Bactérias diazotróficas e fungos micorrizicos arbusculares em diferentes  
genótipos de milho (*Zea mays* L.) / José Antônio Ramos Pereira. - Lavras: UFLA, 1995.  
60p. : il..

Orientador: Romildo da Silva

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras.

Bibliografia.

1. Milho - Genótipo. 2. Bactérias diazotróficas. 3. Fungos micorrizicos  
arbusculares - Ocorrência.. 4. Nitrogenio- Fixação biológica. 5 Simbiose

I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-589.9

-631.847

-633.158947

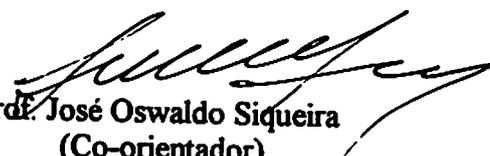
JOSÉ ANTÔNIO RAMOS PEREIRA

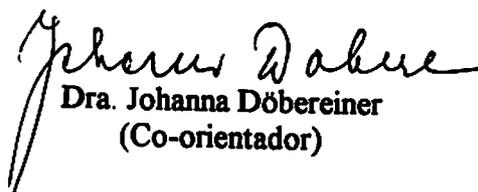
**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E FUNGOS MICORRÍZICOS  
ARBUSCULARES EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE MILHO**

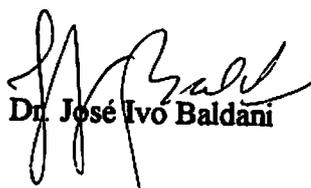
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 07 de dezembro de 1995.

  
Prof. Romildo da Silva  
(Orientador)

  
Prof. José Oswaldo Siqueira  
(Co-orientador)

  
Dra. Johanna Döbereiner  
(Co-orientador)

  
Dr. José Ivo Baldani

## AGRADECIMENTOS

- À EMBRAPA / CNPAB e a Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade do treinamento.
- Ao Curso de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas pela acolhida e compreensão.
- Ao pessoal das Bibliotecas do CNPAB e UFLA (especialmente para Antônio Máximo, Dorimar, Maria Helena e Sérgio Lima) e a gráfica da UFLA, pelas facilidades.
- Aos Drs. Mauro A. de Paula e Verônica M. Reis pelo incentivo.
- Aos colegas Otávio, Fabinho (especial), Fabão, André, Marcão, Ivan (o meio de cultivo errado permitiu bons resultados), Jean (boi danado), Severino, Bolão, Mazinho, Itamar, Vanderleis, Vera Baldani, ao pessoal dos Laboratórios de análises de Solo e planta do CNPAB, Niltinho (especial), Charlinho, Julinho, Wenceslau, Paróm, Zé Pereira, Bonno, Flávia de BH (especial); a minha família pela esperança e a todos que contribuíram para a conclusão deste trabalho.
- Aos Pesquisadores Francisco Adriano de Souza pela identificação taxonômica das espécies de FMA, José Ivo Baldani pelas sugestões e críticas constantes, Paulo Augusto da Eira pela revisão ortográfica do texto, Dejair L. de Almeida pela amizade e apoio, Johanna Döbereiner pela existência e vida.
- Aos Profs. José Oswaldo Siqueira pelos ensinamentos e *evolução*; Edna (Rural-Rio), Moacir Paschoal, Janice Guedes e Fabiano R. do Valle pelo convívio e aprendizado.
- E finalmente, dois *agradecimentos especiais*: ao Prof. *Romildo da Silva* (pai, amigo e irmão de todas as horas) e *Ellen de Oliveira*, pela experiência de ver crescer duas filhas lindas e maravilhosas,

**Luisa (29/01/92) e Julia (15/03/94) a quem**

**Dedico**

## SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE TABELAS.....	v
RESUMO .....	vii
SUMMARY.....	ix
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2. 1 - Bactérias fixadoras de nitrogênio.....	6
2. 2 - Fungos micorrízicos-arbusculares.....	11
3 -MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 -Ensaio 1 - Rede PTA.....	17
3. 2 - Ensaio 2 - CNPAB.....	19
3. 3 - Avaliações da ocorrência de microrganismos.....	21
3. 3 .1 - Bactérias fixadoras de nitrogênio.....	21
3. 2. 2 - Fungos micorrízicos.....	23

<b>4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	24
<b>4.1 - Bactérias fixadoras de nitrogênio</b> .....	24
4.1.1 - Ensaio 1 - Rede PTA.....	24
4.1.2 - Ensaio 2 - CNPAB.....	26
<b>4.2 - Fungos Micorrízicos Arbusculares</b>	
4.2.1 - Ensaio 1 - Rede PTA.....	30
4.2.2 - Ensaio 2 - CNPAB.....	32
4.2.2.1 - Colonização de raízes por FMA.....	32
4.2.2.2 - Ocorrência de esporos de FMA.....	34
4.3 - Produção de matéria seca e grãos, concentração e acúmulo de nutrientes.....	44
<b>5 - CONCLUSÕES</b> .....	49
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. Percentagem de incidencia de <i>Azospirillum</i> spp em raízes e colmos de seis genótipos de milho coletados aos 120 DAE.....	25
2. Percentagem de ocorrência de <i>Azospirillum</i> spp em raízes e colmos de seis genótipos de milho coletados aos 120 DAE.....	25
3. Contagem do número de bactérias diazotróficas (NMP) em raízes lavadas (RL), raízes esterilizadas (RE) e colmos, avaliados aos 40 e 70 DAE em quatro genótipos de milho.....	26
4. Percentagem de ocorrência de <i>A.lipoferum</i> e <i>A. brasilense</i> avaliada aos 40 DAE de quatro genótipos de milho.....	27
5. Percentagem de ocorrência de <i>A.lipoferum</i> e <i>A. brasilense</i> avaliada aos 70 DAE de quatro genótipos de milho.....	27
6. Incidência de bactérias diazotróficas em folhas e colmos de quatro genótipos de milho aos 105 DAE.....	28
7. Percentagem de ocorrência de espécie de bactérias diazotróficas, avaliadas aos 105 DAE de quatro genótipos de milho.....	28
8. Densidade de esporos em 5 localidades nos Estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná e Rio de Janeiro, detectados em seis genótipos de milho aos 120 DAE.....	31
9. Densidade total (N: nº de esporos.50 cm <sup>-3</sup> ) e densidade relativa (DR) de esporos de espécies de FMA durante o ciclo vegetativo de quatro genótipos de milho.....	35
10. Índice de ocorrência das espécies de FMA indígenas durante o ciclo vegetativo de quatro genótipos de milho.....	36
11. Número total de esporos de FMA durante o ciclo vegetativo de quatro genótipos de milho.....	37
12. Número de esporos do gênero <i>Glomus</i> durante o ciclo vegetativo de quatro genótipos de milho.....	37
13. Número de esporos da espécie <i>Glomus etunicatum</i> durante o ciclo vegetativo de quatro genótipos de milho.....	38
14. Número de esporos da espécie <i>Glomus macrocarpum</i> durante o ciclo vegetativo de quatro genótipos de milho.....	38
15. Número de esporos do gênero <i>Scutellospora</i> durante o ciclo vegetativo de quatro genótipos de milho.....	39

16. Número de esporos da espécie <i>Scutellospora heterogama</i> durante o ciclo vegetativo de quatro genótipos de milho.....	39
17. Densidade relativa do gênero <i>Glomus</i> durante o ciclo vegetativo de quatro genótipos de milho.....	40
18. Densidade relativa da espécie <i>Glomus etunicatum</i> durante o ciclo vegetativo de quatro genótipos de milho.....	41
19. Densidade relativa da espécie <i>Glomus macrocarpum</i> durante o ciclo vegetativo de quatro genótipos de milho.....	41
20. Densidade relativa do gênero <i>Scutellospora</i> durante o ciclo vegetativo de quatro genótipos de milho.....	42
21. Densidade relativa da espécie <i>Scutellospora heterogama</i> durante o ciclo vegetativo de quatro genótipos de milho.....	42
22. Produção de matéria seca, concentração e acúmulo de nutrientes em quatro genótipos de milho aos 70 DAE.....	44
23. Produção de grãos, concentração e acúmulo de nutrientes em quatro genótipos de milho aos 140 DAE.....	45
24. Número de espigas/planta e produção de grãos/espiga (g) em quatro genótipos de milho aos 70 e 140 DAE.....	45

## RESUMO

PEREIRA, José Antônio Ramos. **Bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares em diferentes genótipos de milho (*Zea mays* L.)**. Lavras, UFLA, 1995. 60 p. (Dissertação - Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas)\*

O milho, um dos cereais mais plantados no mundo, é a base alimentar para milhões de pessoas e uma das espécies de planta mais estudada e melhorada. Pelo seu crescimento rápido, apresenta elevada demanda de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo; por isso pode se beneficiar da associação com bactérias diazotróficas e da simbiose com fungos micorrízicos arbusculares (FMA). O efeito da inoculação com esses microrganismos é no entanto, muito variável em função de uma série de fatores, principalmente edáficos e da relação planta-microrganismos, ainda pouco estudados. No presente estudo avaliaram-se a ocorrência de bactérias fixadoras de nitrogênio e de FMA em diferentes genótipos de milho em condições de campo, cultivados em solo sem adição de fertilizantes químicos nitrogenados ou fosfatados. Os genótipos de milho estudados foram escolhidos com base em suas características contrastantes quanto a exigência nutricional e ao grau de melhoramento genético, envolvendo quatro genótipos ditos "criollos", um selecionado para uso eficiente de nitrogênio (Nitrodente) e um híbrido duplo comercial (XL 560).

Embora a associação micorrízica seja vista como inespecífica, foi possível estabelecer diferenças genóticas na capacidade de se beneficiar da associação com os microorganismos estudados. Pôde-se verificar diferenças entre os genótipos avaliados quanto ao número de esporos, densidade relativa de espécies e colonização de raízes pelos FMA, assim como no número de bactérias diazotróficas presentes em várias partes das plantas. Verificou-se correlação entre o número de esporos de FMA antes do plantio e bactérias diazotróficas no interior das plantas. Genótipos melhorados mostraram maior ocorrência de bactérias diazotróficas do interior da planta.

---

\* Orientador: Romildo da Silva. Membros da Banca: Johanna Döbereiner, José Ivo Baldani e José Oswaldo Siqueira.

Isolou-se de raízes do genótipo Cravinho, uma estirpe de bactéria pertencente ao gênero *Burkholderia*, a qual se encontra em fase de caracterização. Outros isolados do gênero *Burkholderia* e da espécie *B. cepacea* só foram isolados de genótipos não melhorados. Obtiveram-se 25 isolados da variante natural de *A. lipoferum*, que usa sacarose e tem forma de minhoca, sendo 9 isolados de colmo.

O genótipo Nitrodente apresentou maior produção de massa seca da parte aérea, peso de grãos secos e teores totais de N, P e K que os demais. Verificaram-se mudanças no desempenho dos genótipos Cravinho e XL 560 para produção de massa aos 70 DAE em relação à produção de grãos avaliada aos 140 DAE. Os mesmos apresentaram mudanças na percentagem de colonização de forma oposta, ou seja, XL 560 teve aumentada sua percentagem de colonização micorrizica dos 40 DAE para os 105 DAE, ao passo que Cravinho a teve diminuída na mesma proporção, embora esta diferença não tenha sido significativa em Cravinho.

Conclui-se que o genótipo selecionado para o melhor aproveitamento de nutrientes (Nitrodente), apresentou maior produtividade, sendo apropriado para sistema de baixo nível tecnológico, como as condições experimentais utilizadas, podendo vir a se beneficiar da associação com os microorganismos estudados. Ao contrário, o genótipo geneticamente melhorado para alto nível tecnológico (XL 560), não conseguiu expressar seu potencial produtivo, nas condições do ensaio.

## Summary

### DIAZOTROPHIC BACTERIA AND ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN DIFFERENT MAIZE GENOTYPES (*Zea mays* L.)

Maize is one of the cereal crops most planted in the World, and the staple diet of millions of people. It is probably the species most studied and improved amongst all cultivated crops. Reports showing the effect of the inoculation of diazotrophic bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) indicate the potential of this crop to obtain benefit from these associations, and the importance of the selection of suitable macro and micro- symbiontes.

Different genotypes of maize were planted in two experiments in soils of medium fertility to study their performance in the maintenance of associations with nitrogen-fixing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). The genotypes of maize used were selected on the basis of their contrasting characteristics with respect to nutritional demand and genetic improvement. There was a distinct relationship between the different species of AMF and their capacity to colonise maize roots.

The cultivar Nitrodente showed the best results in terms of the accumulation of shoot dry weight, dry weight of grain and total levels of N, P and K. Changes were observed in the behaviour of the genotypes Caiano and XL 560 in terms of the dry matter production at 70 days after germination (DAG), in relation to grain yield at 140 DAE, and the level of colonisation of the roots by AMF at 40 DAE and 105 DAE in these genotypes. The same genotypes showed changes in the colonisation of roots by AMF and the number of AMF spores in the opposite manner, thus causing low production.

Although mycorrhizal associations are generally regarded as non-specific, it was possible to establish genotypic differences in the capacity to benefit or not from the association with the micro-organisms studied. Differences were observed between the genotypes studied in terms of the numbers of spores, relative density of the species and root colonisation, with regard to the AMF and the number of diazotrophs present in various parts of the plants. A correlation was observed between the number of AMF spores in the soil before planting and the number of diazotrophic bacteria in the interior of the plants. Improved genotypes showed greater recovery of

diazotrophic bacteria in the interior of the plants. It was possible to recover an undescribed species of bacteria of the genus *Burkholderia* sp. from roots of the genotype Cravinho. Isolates from the genus *Burkholderia* and the specie *B. cepacea* were only isolated from the unimproved genotypes Cravinho B. Esperança and Caiano de Sobrália. It was found possible to recover 25 isolates of a natural variant of *Azospirillum lipoferum*, which uses sucrose and has a worm-like form, their being 9 isolates from the stems.

It is concluded that improved genotypes, selected for good production in poor soils, or efficient use of nutrients, could benefit from associations with the micro-organisms studied, in contrast to genotypes bred to respond to high levels of fertilisation.

## 1. INTRODUÇÃO

As últimas décadas foram marcadas por um aumento na demanda mundial por alimentos e pelo desenvolvimento industrial dos países subdesenvolvidos. O financiamento deste desenvolvimento foi feito pela poupança externa, o que impunha uma série de pré-requisitos às nações que o pleiteavam. Os programas e projetos governamentais, praticados ou financiados pelos países desenvolvidos na área agrícola incentivavam a utilização de linhagens altamente responsáveis aos fertilizantes produzidos cada vez em maior escala. A chamada Revolução Verde baseou-se na maior produção por área como a resposta técnico-científica para o problema da fome. Se por um lado este modelo garantiu aos países desenvolvidos produção elevada e excedentes exportáveis, não eliminou o problema crítico da fome na maioria dos continentes e levou à dependência das indústrias de fertilizantes e defensivos químicos e das companhias de sementes. Não é de se estranhar que hoje, as maiores companhias transnacionais da área química (fertilizantes e defensivos) tornaram-se proprietárias de várias empresas de produção de sementes. Uma companhia alemã, por exemplo, comercializa sua própria marca de sementes de sorgo, empacotada junto com três produtos químicos, um dos quais serve para proteger a semente de sorgo da própria companhia contra os efeitos do seu principal herbicida (Hobbelink, 1990). Porém, estão esgotados a curto prazo as possibilidades de avanço no nível de produtividade das culturas de maior importância, não só pelo alto custo financeiro, como também pela poluição causada pela aplicação de altos níveis de adubação. A crescente preocupação com a degradação do meio ambiente e a consciência da necessidade de racionalização do uso dos recursos naturais deram novo enfoque à agricultura, onde ecologia e sustentabilidade são as palavras de ordem.

Os solos no Brasil são em sua maioria deficientes em nitrogênio e fósforo disponível. Além disso, as características edafoclimáticas e dos adubos aplicados levam sempre a perdas por fixação, volatilização e lixiviação. Na rizosfera, os colóides do solo, os exsudados de plantas e os microrganismos formam uma região tampão (a matriz) que faz a comunicação entre a planta e o solo. A introdução de nutrientes no sistema solo-planta por processos biológicos é uma

das formas de suprir a reserva química do solo. As associações simbióticas nesta região participam não só da nutrição da planta por mudanças na disponibilidade de nutrientes, mas também na incorporação dos mesmos ao sistema, caso das micorrizas em relação ao P e das bactérias diazotróficas em relação ao N (Frey & Schüepp, 1992).

O milho é um alimento de considerável importância para milhões de pessoas, sendo que na América de Sul, Ásia e África muitas vezes representa a principal fonte alimentar. O milho fornece 15% da proteína e 19% das calorias produzidas pelas culturas alimentares (Pandey et al 1995). Além da redução na produção causada por doenças, insetos e plantas daninhas, deficiências de nitrogênio e fósforo, toxidez de alumínio e também excesso ou falta de água no solo são fatores comumente limitantes à produtividade do milho. Todos esses estresses ocorrem com maior severidade nas regiões tropicais, os quais são agravados por problemas sócio-econômicos. Convém ressaltar que mais de 80% da produção de milho no Brasil é oriunda de regiões com algum tipo de estresse ambiental, onde mais de 70% dessa produção é realizada por pequenos e médios agricultores, envolvendo uma área superior a 3 milhões de hectares na América do Sul (Pandey et al, 1995). O potencial de utilização da cultura do milho associada à micorrizas e às bactérias diazotróficas tem sido objeto de vários estudos (Fernandes et al, 1987; Pereira e Baldani, 1995), porém a influência de genótipos sobre estas associações tem sido pouco relatado.

Em relação a nutrição, sabe-se que existe uma ampla variação entre genótipos quanto a reação a estresse, sendo esta tolerância um caráter complexo, envolvendo muitos mecanismos fisiológicos diferentes e não totalmente entendidos (Sullivam e Blun, 1970). Plantas mais eficientes no aproveitamento de nutrientes são aquelas que sob determinada condição nutricional, normal ou adversa, conseguem absorver, translocar, acumular e utilizar melhor os nutrientes para produção biológica ou econômica. A associação de plantas com microrganismos é apontada como possível mecanismo de tolerância a diversos fatores adversos da produção (Furlani e Furlani, 1989). A absorção e uso de minerais pelas plantas são geneticamente controlados, podendo ser manipulados no intuito de se obter genótipos adaptados a diferentes condições de estresse mineral, através de seleção e melhoramento genético. Entretanto, os programas de melhoramento de plantas raramente consideram o papel dos microrganismos estudados neste trabalho. Embora diferentes respostas de plantas a diferentes elementos minerais possam elucidar alguns problemas nutricionais e auxiliar no desenvolvimento de métodos de utilização de plantas com maior eficiência no aproveitamento de nutrientes, há necessidade de

determinar os possíveis efeitos dos FMA e das bactérias fixadoras de nitrogênio em cada hospedeiro e solo antes do plantio, para aumentar o potencial de benefício destes microrganismos, pela eficiência de utilização do hospedeiro (Espinoza-Victoria et al, 1993).

Plantas associadas a FMA mostram respostas à inoculação que vão desde a simbiose mutualista à parasítica (Smith ; Muscatine e Lewis, 1969). No caso da simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, o microsimbionte tem acesso ao nitrogênio gasoso ( $N_2$ ) que fica disponível para a planta. Considerando as associações simbióticas biotróficas os maiores drenos são carbono e nitrogênio (aminoácidos), embora todos os nutrientes requeridos pelos fungos sejam supridos pela planta (Smith & Smith, 1990). As bactérias fixadoras de nitrogênio e os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) participam, juntos ou separadamente em processos até de sobrevivência do hospedeiro, como no trabalho de Mosse (1972), quando plantas de *Paspalum notatum* só sobreviviam em condição de casa de vegetação, quando inoculadas com FMA. A associação *Paspalum notatum* cv batatais X *Azotobacter paspali* já havia sido caracterizada como muito específica por Döbereiner (1966).

As micorrizas são consideradas efetivas quando estimulam o crescimento do hospedeiro (Abbott e Robson, 1981), sendo este estímulo normalmente encontrado em níveis intermediários de P (Bethlenfalvay ; Bayne e Pacovski, 1983), aparentemente resultado do aumento do fluxo de P causado pelo fungo. Porém, a ênfase dada ao P mascara outros efeitos dos FMA, normalmente mencionando-se apenas a relação custo-benefício da associação (Rajú et al., 1990). Já que diferenças genotípicas em absorção de nutrientes são bem documentadas (Clark, 1983) e tratando-se de um fator biológico com potencial para afetar a eficiência de utilização de diversos nutrientes, é razoável supor-se que micorrizas poderiam estar envolvidas nestas diferenças genotípicas, já que o desenvolvimento de infecção micorrizica está sob controle genético da planta (Smith; Robson e Abbott, 1992). De fato, estudos recentes relatam diferenças marcantes para colonização de raízes entre milho híbrido e milho nativo na Espanha (Quintero-Ramos et al, 1993), com milho nativo apresentando maior taxa de colonização de raízes que o híbrido, embora diferentes endófitos tenham sido mais importantes que a intensidade de colonização na resposta do hospedeiro. Menge et al (1978) encontraram mediação do hospedeiro no efeito do P na colonização pelo fungo e os dados de Toth et al (1984) são conflitantes quanto a performance de híbridos e genótipos não melhorados em relação à colonização por FMA, se comparados aos de Quintero-Ramos et al. (1993).

São poucos os trabalhos disponíveis com a cultura do milho em relação à genótipos e sua associação com bactérias fixadoras de nitrogênio. Porém, alguns resultados sobre a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo do N e na fixação biológica (Baldani; Blaña e Döbereiner., 1979; Bülow e Döbereiner, 1975; Döbereiner e Solomone, 1995; Machado et al, 1992; Machado e Magalhães, 1995, Magalhães e Machado, 1995, Pereira et al, 1976) representam os primeiros passos para um trabalho de seleção de materiais mais promissores para utilização em programas de melhoramento da cultura do milho associada a bactérias fixadoras de nitrogênio. A exceção de Döbereiner e Solomone (1995), nenhum destes trabalhos considera a população ou os efeitos dos microorganismos.

Considerando a necessidade de expansão da agricultura para áreas com solos de baixa fertilidade, o uso mais eficiente dos insumos, o alto custo relativo a fertilização e a exaustão das fontes de matéria prima, o presente trabalho teve como objetivos avaliar a ocorrência de micorrizas arbusculares e de bactérias fixadoras de nitrogênio em genótipos de milho melhorados e não melhorados e identificar genótipos com maior potencial para aproveitamento em programas de seleção de plantas que utilizem (ou ao menos considere) os microorganismos economizadores de nutrientes. A utilização destes microorganismos no aumento da disponibilidade e na adição biológica de nutrientes ao sistema solo-planta (caso dos FMA e das bactérias fixadoras de nitrogênio), representa a curto prazo a possibilidade de obter-se produtos de qualidade a baixo custo, com reflexos na melhoria da qualidade de vida e do meio ambiente e ainda a base para uma sociedade mais justa com seus pares e com a própria natureza, através da agrobiologia.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A maioria dos programas de melhoramento de plantas que visam aumentos de produção (também outros que não os especificamente relacionados a nutrição de plantas) utilizam altos níveis de fertilizantes. Nestas condições a colonização por microorganismos economizadores de nutrientes e seus efeitos no hospedeiro são mínimos ou antagônicos, geralmente não sendo considerados ou monitorados. O material melhorado torna-se portanto excelente produtor de fotossintatos, apresentando crescimento inicial vigoroso. Porém, descarta-se a possibilidade de se identificar genótipos que obtenham rápida infecção e colonização, sendo a resposta positiva anulada ou ignorada (Krishna et al., 1985). O potencial de utilização dos microorganismos estudados neste trabalho, no desenvolvimento e nutrição mineral das plantas, precisa ser considerado em programas de melhoramento para maximizar a eficiência de utilização de nutrientes em culturas que demonstrem variabilidade na colonização ou na resposta à infecção. Se os mesmos não são considerados nestes trabalhos, o potencial de utilização desta variabilidade pode ser perdido, eliminando um forte aliado na melhor utilização da inoculação na nutrição das plantas. De fato, Hobbelink (1990) e Altieri (1989), mostram um cenário obscuro para os não detentores de tecnologia ou capital, a exemplo do que ocorreu em várias regiões do terceiro mundo, que doaram germoplasma de seus melhores genótipos de várias culturas para obtenção de híbridos; hoje sobrevivem de doações do alimento diretamente ou através de sementes, melhoradas para outro ambiente, ou que perderam importantes características devido ao modelo utilizado para sua obtenção. Hoje, volta a existir uma preocupação em relação ao resgate de plantas alimentares de populações nativas. Em milho, estas populações são chamadas “criollo” e se caracterizam pela utilização de poucos insumos e pela forma doméstica como são selecionados manualmente dos melhores exemplares da última colheita para plantio da próxima, considerando seu tamanho, forma e cor. Embora sejam consideradas plantas domesticadas, espera-se que o milho “criollo”, tenha respostas diferenciadas das novas variedades com alta produção em resposta à fertilização, irrigação e práticas agrícolas (Gavito & Varela, 1995).

## 2.1- Bactérias diazotróficas

As plantas assimilam nitrogênio do solo principalmente nas formas de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ , podendo também ser fixado da atmosfera, forma esta utilizada apenas por alguns tipos de bactérias. As bactérias fixadoras de nitrogênio, através da nitrogenase (complexo enzimático que exige energia na forma de ATP) catalisam a redução do nitrogênio molecular para amônio que é assimilável pelas plantas. O nitrogênio é transportado nas plantas na forma de aminoácidos. Em gramíneas, tais como o milho, a glutamina é a via preferencial. Nas leguminosas, a redução do nitrogênio para amônio (FBN) ocorre principalmente nas raízes, dentro de estruturas visíveis, formados pela simbiose com bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*. Nas gramíneas não ocorre a formação de estruturas visíveis nas raízes. No entanto, durante as últimas décadas, acumulou-se um grande número de evidências relatando a presença de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas às raízes de gramíneas e mais recentemente no interior de colmos e folhas, com a demonstração de habitat preferencialmente endofítico de alguns gêneros (Döbereiner, 1992 a e b; Döbereiner & Baldani, 1995; Koepler & Beauchamp, 1992).

Diferentes bactérias heterotróficas que fixam nitrogênio têm sido isoladas de raízes e rizosfera de várias gramíneas. No entanto, a identificação de bactérias responsáveis pela fixação de  $\text{N}_2$  requer a demonstração de interações que justifiquem a distinção entre um convívio ocasional e uma associação simbiótica (Döbereiner, 1979). Entre as bactérias fixadoras de nitrogênio que se associam com gramíneas, as do gênero *Azospirillum* são as mais bem estudadas. Isto se deve principalmente ao fato de ter sido isolada da cultura do milho por Bülow e Döbereiner (1975), que relataram um alto potencial de fixação de nitrogênio deste cereal. Uma interação muito específica entre uma bactéria fixadora de  $\text{N}_2$  e uma planta, é a associação entre *Azotobacter paspali* e *Paspalum notatum* descrita por Döbereiner (1966). Trabalhos posteriores, mostraram que ecologicamente essa bactéria se associa principalmente ao ecotipo *Paspalum notatum* cv batatais (Döbereiner, 1970). A atividade da nitrogenase, associada com a cultivar batatais é muito maior do que em outras variedades de gramíneas (Döbereiner; Day e Dart, 1972).

A primeira espécie de *Azospirillum* sp foi isolada em 1925 por Beijerinck. Por apresentar forma espiralada, em meio de cultivo contendo glicose e manitol, Beijerinck (1925) considerou

esta bactéria como do gênero *Spirillum* sendo posteriormente chamada de *Spirillum lipoferum* (Beijerinck, 1925). Baseado em diferenças fisiológicas, morfológicas e de homologia de DNA-RNA, Tarrand; Krieg e Döbereiner (1978) reclassificaram a espécie *Spirillum lipoferum*, criando um novo gênero, *Azospirillum*, com duas novas espécies: *Azospirillum lipoferum* (Sin. *Spirillum lipoferum*) e *Azospirillum brasilense*. Mais tarde três outras espécies foram descritas: *A. amazonense* (Magalhães et al, 1983), *A. halopraeferans* (Reinhold et al, 1987) e *A. irakense* (Khammas et al, 1989).

Espécies de *Azospirillum* spp são encontradas em associações com raízes de milho (Bülow e Döbereiner, 1975; Ohara; Davey e Lucas, 1981), *Digitaria decumbens* (Döbereiner e Day, 1975), trigo (Baldani; Baldani e Döbereiner, 1983), arroz (Watanabe et al, 1979; Heulin et al., 1989; Khammas et al, 1989), sorgo (Lakshmi et al., 1977) e várias outras gramíneas forrageiras e cereais, além do solo. *Azospirillum* spp colonizam a superfície da raiz de gramíneas (Bashan e Levanony, 1987; Gafny et al, 1986; Patriquin; Döbereiner e Jain, 1983; Umali-Garcia et al, 1980), o interior do córtex da raiz de cereais (Levanony et al., 1989; Patriquin e Döbereiner, 1978) e no interior das plantas de milho (Magalhães; Patriquin e Döbereiner, 1979). Pode ser isolada de solos cultivados com gramíneas de regiões temperadas (Reynders e Vlassak, 1976; Sloger e Owens, 1978) e tropicais (Day e Döbereiner, 1976; Khammas et al, 1989; Magalhães et al, 1983; Reinhold et al, 1987). No entanto a maior parte dos investigadores considera que este microrganismo tem especial importância nos trópicos (Neyra e Döbereiner, 1977). Döbereiner; Mariel e Nery (1976) citam que *Azospirillum* foi isolado em menos de 10% das amostras de solo de rizosfera e raízes de regiões temperadas. Em contraste, mais de 50% das amostras de regiões tropicais foram positivas. Nestas regiões, números na faixa de  $10^6$  a  $10^7$  células de *Azospirillum* por grama de raízes ou solo podem ser encontrados durante o ciclo vegetativo de milho e sorgo (Döbereiner, 1977).

Durante contagens de *Azospirillum* em raízes de cereais, Baldani (1984) observou a ocorrência de um organismo pequeno e vibróide, não sendo identificado como nenhuma das espécies até então descritas. Com base em estudos genéticos de homologia de DNA, foi proposto um novo gênero com uma espécie, *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani et al, 1986). Recentes análises de DNA:RNA, mostraram que *Pseudomonas rubrisubalbicans*, bactéria causadora de estrias mosqueadas na cana de açúcar deve ser incluída neste gênero (Gillis et al, 1990). Pimentel

et al (1991) observaram que existem algumas características fisiológicas idênticas entre essas duas bactérias. Porém, estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* não mostraram patogenicidade em cana-de-açúcar, quando inoculadas artificialmente na variedade B-4362, citada como susceptível a estria mosqueada (Galli et al, 1980). Em trabalho posterior, Baldani et al, (1992) utilizando meio semi-sólido (JNFb) mais específico para o crescimento de *Herbaspirillum seropedicae*, concluíram que a ocorrência desta bactéria não é restrita aos cereais, sendo reisolada de algumas gramíneas forrageiras e cana-de-açúcar. Foi verificada uma baixa capacidade de *Herbaspirillum seropedicae* sobreviver no solo sem a planta, sugerindo tratar-se de uma bactéria com características endófitas (Döbereiner et al, 1993).

Utilizando meio semi-sólido e tendo caldo de cana como componente, Cavalcante & Döbereiner (1988) isolaram uma nova bactéria, descrita por Gillis et al (1990). Denominada *Acetobacter diazotrophicus*, esta bactéria cresce e fixa nitrogênio com até 30% de açúcar (ótimo de 10%) e pH até 2.5 (ótimo de 5.6). Não reduz nitrato e com isto é capaz de fixar nitrogênio em meio com altas concentrações de  $\text{NO}_3$ . Assim, o nitrato assimilado pelas plantas não compete com o processo de fixação de nitrogênio, fato que nas associações com outras bactérias fixadoras de nitrogênio, e mesmo com as leguminosas, pode ser potencialmente limitante (Boddey et al, 1990). *Acetobacter diazotrophicus* ocorre como endófito nas raízes, no colmo e também nas folhas de cana-de-açúcar e é disseminada principalmente pelos toletes. Esta bactéria não foi encontrada em plantas propagadas por sementes, parecendo ser específica para algumas espécies ricas em açúcares e que são propagadas vegetativamente (Boddey et al, 1990). Evidências desta característica endofítica são bem ilustradas em trabalhos de Döbereiner et al (1993), que verificaram a ocorrência de números altos desta bactéria nos colmos e na palha de cana-de-açúcar em decomposição.

Foi estimado um potencial de fixação biológica em milho de até  $2 \text{ kg N.ha}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  (Bülow & Döbereiner, 1975) e em *Paspalum notatum* cv batatais de  $90 \text{ kg N.ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$  (Döbereiner ; Day e Dart, 1972). Mais recentemente, a técnica da diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  (Macauliffe et al, 1958) começou a ser utilizada para medir a fixação biológica de nitrogênio durante todo o ciclo da cultura. Foi demonstrado que a fixação biológica de nitrogênio pode contribuir com até 20-40% ( $10 \text{ kg N.ha.mês}$ ) do N total acumulado em *Paspalum notatum*, *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria humidicola* e alguns ecotipos de *Panicum maximum* (Boddey et al, 1983 a,b; Boddey

e Victoria, 1986; Miranda e Boddey, 1987; Miranda; Urquiaga e Boddey, 1990). Lima; Boddey e Döbereiner, (1988) em experimento de balanço de nitrogênio com solo marcado com  $^{15}\text{N}$  mostraram que a variedade de cana de açúcar CB 47-89 acumulou muito mais matéria seca e nitrogênio ( $25 \text{ g N planta}^{-1}$ ) do que as outras, indicando que esta variedade acumulou o equivalente a  $150 \text{ kg N ha}^{-1}$  derivado da fixação biológica de nitrogênio. Até o momento, apenas em cana-de-açúcar, gramíneas forrageiras tropicais e arroz irrigado tem sido mostrado significativo ingresso de N proveniente da fixação biológica de  $\text{N}_2$ . Evidências de que outros cereais obtêm N proveniente da fixação biológica não são consistentes e os dados disponíveis são insuficientes (Boddey e Döbereiner, 1988).

Embora um número considerável de trabalhos mostrem aumentos significativos do conteúdo de nitrogênio na planta proveniente da inoculação com *Azospirillum* sp (Pereira e Baldani, 1995), vários resultados colocam em dúvida se todo N incorporado às plantas provém da fixação biológica. Kapulnik et al (1985) e Boddey e Döbereiner (1988), observaram que a inoculação com *Azospirillum* sp proporcionou um acúmulo de nitrogênio e maior produção de trigo. Porém, pela técnica da diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ , foi constatado que o incremento de nitrogênio não foi devido a fixação biológica de nitrogênio, e sim a produção de fito-hormônios, como IAA, induzidos pela bactéria ( Tien; Gaskins e Hubbell, 1979; Jain e Patriquin, 1984 ). Pela mesma técnica e utilizando plantas de trigo inoculadas com estirpes homólogas de *A. brasilense* mutante negativa para atividade da Redutase do Nitrato ( $\text{RN}_{\text{-asc}}$ ) foi demonstrado que o aumento na incorporação de  $^{15}\text{N}$  foi causado pelo aumento da assimilação de nitrato e não devido a fixação biológica de nitrogênio (Boddey e Vitória, 1986; Ferreira; Fernandes e Döbereiner, 1987). O aumento da área de superfície das raízes inoculadas, proporcionando uma melhor absorção de nutrientes e água pelas plantas (Kapulnik et al, 1982; Okon, 1985) também é citado como um dos fatores responsáveis pelos resultados que mostram benefícios da inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio.

Para que o potencial de fixação de  $\text{N}_2$  seja expressado e haja estabelecimento da bactéria, é necessário que a estirpe inoculada seja mais competitiva e específica que os microorganismos nativos (Garcia de Salamone, 1993; Pereira et al, 1988; Pereira e Baldani, 1995). Estudos realizados por Döbereiner (1982) mostraram a importância do uso de estirpes específicas de *Azospirillum* para se obter um efeito benéfico no estabelecimento da bactéria na raiz da planta

hospedeira. A importância da seleção de estirpes ficou ainda mais evidenciada pelos resultados obtidos por Baldani ; Baldani e Döbereiner (1987) com trigo sob condições de campo. Somente as duas estirpes originalmente isoladas de raízes esterilizadas de trigo (estirpes homólogas), *A. brasilense* Sp 245 e SP 107, estabeleceram-se nas raízes, responderam consistentemente melhor a inoculação e aumentaram significativamente o N total acumulado na parte aérea. Outros resultados confirmaram um melhor estabelecimento de estirpes homólogas: Sp 245 e Sp 107 em trigo e *A. lipoferum* S82 em sorgo (Baldani et al, 1986; 1987; Pereira et al, 1988). Em Israel, respostas positivas à inoculação foram observadas mesmo com estirpes heterólogas de *Azospirillum brasilense* Cd em trigo (Bashan e Levanony, 1987; Kapulnik et al, 1985), milho (Kapulnik et al, 1982) e sorgo (Kapulnik et al, 1981).

Por outro lado resultados recentes de Döbereiner e Solomone (1995), em experimento de campo com a cultura do milho, destaca um grupo de genótipos, que, teve a atividade da  $RN_{-asc}$  reduzida (até -46 %) e alto incremento na produção de grãos (até 94 %) em relação às plantas não inoculadas. Embora este grupo de genótipos tenha apresentado redução na atividade da  $RN_{-asc}$  causada pela inoculação, tiveram a mais alta taxa de formação de  $NO_2$ , mostrando alta  $RN_{-asc}$ . Este mesmo grupo de genótipos apresentou os menores valores para produção de grão, não levando a resultados conclusivos. Neste trabalho, os dois genótipos mais produtivos, tiveram sua produção de grãos reduzida pela inoculação, embora apresentassem maior índice de colheita para N e maior  $RN_{-asc}$ . Outro grupo de genótipos teve reduzida  $RN_{-asc}$ , quando da inoculação com uma mistura de seis estirpes de *A. lipoferum*, sendo sempre positiva a resposta na produção de grãos, que variou significativamente de 20 a 94%. Os autores indicam uma rota alternativa, via hormônio, para relatar o efeito diferenciado da inoculação à campo de *Azospirillum* nos genótipos de milho, com base nas amostragens feitas aos 40 dias, no campo. Infelizmente, não são fornecidos nível de fertilidade ou da atividade da nitrogenase, para comparação com os dados de Baldani ; Blana e Döbereiner (1979).

## 2.2.- Fungos micorrízico-arbusculares

O fósforo é um dos macronutrientes exigidos em menores quantidades pelas plantas, não obstante isso, trata-se do elemento mais usado na adubação no Brasil (Raij, 1987). Assim, a baixa disponibilidade de P representa um dos problemas agronômicos mais sérios nos trópicos úmidos, onde predominam solos ácidos (oxissolos e ultissolos) com elevados teores de óxi-hidróxidos de ferro e alumínio como também de caulinita, os quais fixam grande quantidade de P. Nestas condições, são necessárias enormes quantidades de fertilizantes fosfatados para corrigir a deficiência deste elemento.

A maior eficiência na absorção de P por plantas micorrizadas se deve basicamente a exploração de um volume maior de solo e ao movimento de P mais rápido nas hifas fúngicas do que no solo (Bolan, 1991). Plantas micorrizadas apresentam um aumento na absorção de fontes pouco solúveis como fosfatos de ferro e alumínio e rochas fosfatadas, possivelmente pelo deslocamento do equilíbrio das reações de fixação de P (Bolan, 1991).

As micorrizas arbusculares são associações entre raízes de plantas vasculares e fungos da Ordem Glomales (Morton e Benny, 1990). Nesta associação, o macrosimbionte (planta) e o microsimbionte (fungo), se interrelacionam de forma dinâmica e com perfeita interação morfológica e fisiológica. A penetração e colonização do fungo nas raízes da planta hospedeira, resultam em modificações na fisiologia, bioquímica e nutrição da planta hospedeira, exercendo enorme efeito sobre o seu comportamento (Siqueira e Franco, 1988). Os efeitos benéficos das associações com fungos micorrízico-arbusculares (FMA) sobre a planta hospedeira, já estão amplamente demonstrados na literatura (Mosse, 1973; Sanders ; Mosse e Tinker, 1975; Siqueira e Franco, 1988; Sieverding, 1991). Destaca-se especialmente o aumento na absorção de fósforo (Mosse, 1973; Bolan, 1991).

A colonização de uma planta micotrófica se dá a partir de propágulos infectivos presentes no meio de crescimento do vegetal. Estes podem provir de esporos, micélio externo e ou interno (raízes infectadas contendo vesículas ou clamidosporos). Como os FMA são de ocorrência generalizada na maioria dos solos, para que uma planta responda a inoculação com um

determinado inóculo, o solo deverá ter um baixo potencial de inóculo, ou alternativamente que ocorram espécies menos efetivas em promover o crescimento das plantas do que o fungo introduzido (Abbott e Robson, 1982).

Várias metodologias vêm sendo empregadas usualmente na avaliação da ocorrência dos fungos MA. Estas incluem: (a) extração e contagem de esporos (Gerdemann e Nicolson, 1963); (b) taxa e comprimento de raízes colonizadas (Giovannetti e Mosse, 1980), (c) estimativa da densidade de propágulos infectivos (esporos, hifas e raízes colonizadas) presentes no solo, utilizando a técnica do número mais provável (NMP; Porter, 1979). A percentagem do comprimento de raízes colonizadas ou a percentagem de raízes colonizadas, são tradicionalmente utilizados como método de avaliação da micorrização (Schwab ; Menje e Tinker, 1991), embora não seja um parâmetro consistente quando correlacionado a outros valores (Vierheilig e Ocampo, 1991). As maiores críticas feitas aos métodos mais utilizados, devem-se ao fato de que esta medição depende de ambos, do fungo e da taxa de crescimento das raízes (Schwab; Menje e Tinker, 1991) e mais, pelo fato de ser uma avaliação pontual, normalmente feita em uma única época e pela destruição das plantas. Outra consideração a ser feita é o tempo que os segmentos de raízes se mantêm infectados (Buwalda et al, 1982) e a flutuação destas taxas.

Um perfeito entendimento da ecologia das espécies de FMA é necessário para um melhor aproveitamento desta simbiose, principalmente em sistemas agrícolas de baixos insumos (Dodd e Jeffries, 1986; Siqueira e Saggin, 1995).

O benefício advindo das associações micorrízicas é dependente de uma interação entre o sistema radicular da planta hospedeira com os fungos em determinadas condições edafoclimáticas. Assim, em um determinado local (solo) pode ocorrer uma população de FMA nativos com endófitos eficientes ou não. Respostas a inoculação ocorrem quando a população nativa é ineficiente e/ou o potencial de inóculo seja baixo (Abbott e Robson, 1982). Como foi mostrado por Howeler e Sieverding (1983), nos locais onde ocorria uma população de FMA efetiva e com alto potencial de inóculo, não havia resposta a inoculação com *Glomus manihotis*. Mesmo quando foram utilizadas diferentes fontes e níveis de material de inóculo, a inoculação com fungos desta espécie em outro local onde o potencial de inóculo era baixo e a população era composta por espécies ineficientes, a inoculação promoveu um significativo aumento na produtividade da mandioca até um nível intermediário de 100 kg de P por hectare (Howeler e Sieverding , 1983). O

conhecimento da densidade de propágulos infectivos, capacidade infectiva e efetividade dos fungos FMA nativos é fundamental para o desenvolvimento de estudos sobre ecologia e manejo destes fungos, bem como para auxiliar na introdução de fungos exóticos ao sistema, quando for necessário (Abbott e Robson, 1991).

Espinoza-Victoria et al (1993) sugerem que há necessidade de determinar os possíveis efeitos dos FMA e das bactérias fixadoras de nitrogênio em cada hospedeiro e solo antes do plantio, para aumentar o potencial de benefício destes simbioses, pela eficiência de utilização do hospedeiro, embora informações sobre diferentes respostas de plantas a diferentes elementos minerais possam elucidar alguns problemas nutricionais e auxiliar no desenvolvimento de métodos de utilização de plantas com maior eficiência de utilização de nutrientes. No mesmo trabalho são demonstrados níveis de N aumentados pela inoculação (baixo N no solo), mostrando que o fungo modifica o estado nutricional em um mesmo solo e que o hospedeiro modifica os efeitos dos fungos. Estes resultados foram obtidos com plantas melhoradas (híbridos) e nativas na cultura do milho. Em solo com alto P, foram obtidos níveis de P menores quando inoculados com *Glomus etunicatum* do que no controle não inoculado, nos genótipos híbrido e nativo. Embora este pareça basicamente um efeito de diluição pelo maior crescimento da planta devido à maior quantidade de N disponível ( já que P não era limitante ) existem variações dentro de uma mesma espécie (milho), podendo em alto P a resposta ser positiva ou negativa (Bertheau ; Gianinazzi Pearson e Gianinazzi, 1980). Plantas associadas a FMA diferem quanto ao efeito destes fungos, variando de uma simbiose parasítica a mutualística (Dhillion e Ampornpan, 1992). Enquanto o aumento no crescimento de plantas associadas a FMA é direta ou indiretamente atribuído a fatores nutricionais (Hayman, 1983), os efeitos depressivos causados pela colonização destes fungos, são atribuídos a competição hospedeiro/fungos por carboidratos (Buwalda e Goh, 1982).

Dados da literatura atribuem a algumas espécies de FMA uma seletividade preferencial entre as espécies de uma determinada população dos FMA e os macrosimbiontes (Mcgonigle e Fitter, 1990; Schenck e Kinlock, 1980; Mosse; Stribley e Le Tacon, 1981). Esta seletividade sofre influência direta das condições edafoclimáticas e dos tratos culturais (Sieverding, 1989). As plantas diferem também quanto ao benefício desta simbiose sendo classificadas entre micotróficas obrigatórias e facultativas. Já as ditas não micotróficas representam um grupo bastante limitado (Siqueira e Franco, 1988). Janos (1980) teoriza que o predomínio de certas espécies vegetais em

um ecossistema é influenciado por esta característica simbiótica dos fungos com os diversos vegetais, sendo também dependente do nível de fertilidade do solo e da presença destes endófitos no local. Assim, diversas culturas de importância econômica só se desenvolvem em condições naturais em associação efetiva com estes fungos, tais como: mandioca, citrus, alho, cebola, kudzu, estilosantes (Yost e Fox, 1979; Lopes et al 1983). O desenvolvimento da associação micorrizica está sob controle genético da planta (Smith ; Robson e Abbott, 1992) e a resposta do crescimento da planta à micorrização depende da planta, do fungo e do ambiente e solo. Para aumentar a eficiência desta associação deve-se manipular um ou mais destes fatores (Krishna et al., 1985).

Trabalhando com milho, Quintero-Ramos; Espinosa-Victoria e Ferrera Cerrato (1993) encontraram diferenças significativas no peso da matéria seca entre híbrido e nativo. Milho nativo respondeu mais eficientemente à inoculação com FMA que o híbrido. O efeito de diferentes endófitos foi mais importante que a intensidade de colonização nas respostas do hospedeiro. Krishna et al (1985) obtiveram resultado oposto e sugerem que diferenças genotípicas na colonização micorrizica e sua distribuição, são dependentes do genótipo em milheto, obtendo respostas diferenciadas no crescimento da planta e na resposta à maior disponibilidade de P e à inoculação. Eles demonstraram que genótipos de milheto apresentam diferenças na micorrização quando expostos a inoculação com um único fungo ou em mistura, e ainda sugere que seleção de genótipos que obtenham rápida e extensiva colonização devem ser considerados nos programas de melhoramento: o genótipo 5912 obteve máxima resposta ( maior dependência micorrizica ) e acumulou menor quantidade de massa seca quando não inoculado. A percentagem de colonização variou entre os parentais e progênes, sugerindo diferença hereditária, o que possibilita o melhoramento neste aspecto. Mais ainda , o fator para alta colonização é dominante quando se cruzam plantas de alta e baixa susceptibilidade (Krishna et al,1985).

Toth et al (1990) afirmam que o controle genético exercido por diferentes espécies e variedades de ambos, a planta e o fungo, são provavelmente os fatores mais importantes a influenciar a micorrização. O mesmo autor, trabalhando com milho em um ensaio que visava a obtenção de plantas melhoradas para resistência a fungos patogênicos, observou que linhagens selecionadas para maior resistência obtinham menor colonização e maior sistema radicular. Sem determinar a seqüência causa-efeito, estes autores asseguram que independente da causa, o programa de melhoramento para resistência a doença em milho influenciou a capacidade da planta

formar micorrizas. Tewari et al (1993) trabalhando com genótipos de milho inoculado com *G. caledonicum* e não inoculado, encontraram diferenças marcantes em relação à eficiência micorrizica de dois genótipos. O genótipo HR-374 apresentou maior parte aérea e matéria seca no geral, independente da micorrização. Neste genótipo, a % de eficiência micorrizica e a colonização das raízes são também significativamente maiores. No genótipo PES-400, raízes não micorrizadas apresentavam volume de raízes muito menores que quando micorrizadas, e também menor taxa de colonização. Neste caso a eficiência micorrizica foi significativamente maior. Porém, neste trabalho conclui-se que o elo entre causa e efeito é confuso, pois se o genótipo HR-374 “per si” apresentava resultados acima de outros genótipos, seu valor no índice de eficiência micorrizica pode diferenciar-se dos demais, pelo maior volume radicular que o mesmo comporta. Neste caso o genótipo da planta influenciou a taxa de distribuição das micorrizas, parecendo que a demanda da planta hospedeira pôde determinar, pelo menos parcialmente, a resposta-induzida das micorrizas. A maioria dos estudos de variação genética na colonização envolve normalmente plantas adultas e as comparações são feitas na máxima infecção ou não, refletindo ou dependendo de fatores da planta, não mencionados, não refletindo a história inicial da infecção (Smith; Robson e Abbott, 1992).

Embora seja tida como inespecífica, devido a distribuição de várias espécies de FMA associadas a um amplo espectro de hospedeiros, a maioria das evidências da não especificidade nas associações micorrizicas é baseada em dados de casa de vegetação que utilizam inóculo monoespecífico (Gerdermann e Trappe, 1974; Harley e Smith, 1983; citados por Mcgonigle e Fitter, 1990). Não se considera a possibilidade de no campo, a inoculação mista (expondo o hospedeiro a várias espécies simultaneamente) propiciar uma seleção preferencial do hospedeiro por uma espécie de fungo. Este fenômeno é denominado especificidade ecológica, sendo normalmente descrito para as ectomicorrizas (Harley e Smith, 1983, citados por Mcgonigle e Fitter, 1990). Estes autores apresentam evidências à nível de campo, de que este tipo de especificidade ocorre também nas endomicorrizas. Mosse, Stribley e Le Tacon (1981) mostram uma pequena especificidade para infecção no hospedeiro por diferentes endófitos. A associação preferencial entre certas plantas e espécies de fungos pode ser avaliada considerando-se as combinações que obtenham maior estímulo no crescimento da planta e a maior colonização de raízes ou máxima esporulação, porém, estes três fatores não são necessariamente correlatos (Mosse, 1973). Os fatores que determinam a afinidade FMA-hospedeiro não foram estabelecidos,

porém não há dúvidas da sua importância. Vários autores advogam o uso do melhoramento de plantas para aumentar a susceptibilidade do hospedeiro e com isto aumentar a eficiência das micorrizas (Krishna et al, 1985).

Já que diferenças genotípicas em absorção de nutrientes são bem documentadas (Clark, 1983) e que as micorrizas são um dos fatores biológicos com potencial para afetar a eficiência de utilização de vários nutrientes (Amijee, Stribley e Tinker, 1993), o estado da planta em relação a micorrizas deve ser considerado, sendo razoável supor-se que micorrizas podem estar envolvidas nestas diferenças genotípicas (Amijee, Stribley e Tinker, 1993).

Muitos programas de melhoramento de plantas (também outros que não os especificamente relacionados a nutrição de plantas) utilizam altos níveis de fertilizantes. Nestas condições a colonização por microorganismos economizadores de nutrientes e seus efeitos no hospedeiro são mínimos ou antagônicos, geralmente não sendo considerados ou monitorados. Nestas condições o material melhorado torna-se excelente produtor de fotossintatos, apresentando crescimento inicial vigoroso. Porém, descarta-se a possibilidade de se identificar genótipos que obtenham rápida infecção, sendo a resposta positiva anulada ou ignorada (Krishna et al, 1985). O potencial de utilização dos microorganismos estudados neste trabalho, no desenvolvimento e nutrição mineral das plantas precisa ser considerado em programas de melhoramento, para maximizar a eficiência de utilização de nutrientes em culturas que demonstrem variabilidade na colonização por estes microorganismos ou na resposta da produção à inoculação. Se os mesmos não são considerados nestes trabalhos de melhoramento, o potencial de utilização desta variabilidade pode ser perdido, já que altos níveis de fertilização inibem essas associações simbióticas, eliminando um forte aliado na melhor utilização da inoculação na nutrição das plantas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo constou de avaliações da ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares, através do número de esporos do solo da rizosfera de seis genótipos de milho e da percentagem de colonização de raízes, e de bactérias diazotróficas em amostras de material de planta frescos coletados em dois ensaios, instalados nos anos de 1992 (Assessoria e Projetos em Tecnologia Alternativa/AS-PTA) e 1993 (CNPAB- Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia).

#### 3.1- Ensaio 1- Rede PTA

Foi realizado em cooperação com a AS-PTA (Organização Não Governamental). Instalado em Outubro de 1992, foi derivado do convênio da Rede PTA com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) / CNPAB, em que 40 genótipos de milho foram plantados em 20 locais no país. Destes ensaios, seis genótipos foram avaliados neste experimento, em relação ao número de esporos no solo da rizosfera de 5 localidades, sendo duas no Estado de Minas Gerais [Governador Valadares (GV) e Montes Claros (MC)], uma no Estado do Paraná (PR), uma no Estado do Espírito Santo (ES) e uma no Estado do Rio de Janeiro (RJ). O solo foi coletado o mais próximo possível das raízes no estágio de enchimento do grão (120 dias após a emergência das plantas), evitando-se porém danificá-las, já que as plantas (duas por parcela) eram parte de outro ensaio mais abrangente. No ensaio do Estado do Rio de Janeiro (Município de Queimados), tivemos acesso a pequena quantidade de raízes e colmos frescos, onde avaliou-se a percentagem de incidência de bactérias diazotróficas e a percentagem de ocorrência de diferentes espécies de bactérias do gênero *Azospirillum*. Esta área no Rio de Janeiro foi tradicionalmente utilizada para o plantio de mandioca. Não foi possível ter acesso a dados de produtividade ou nutricionais de nenhuma das áreas avaliadas,

como também não foi possível proceder-se a análise taxonômica dos esporos, dado ao estado de conservação dos mesmos.

O delineamento experimental destes ensaios foi o de blocos ao acaso com três repetições e seis tratamentos (genótipos). As parcelas eram constituídas de 2 linhas espaçadas de 0,8 m, com uma população de 5 plantas por metro linear. Os dados referentes à percentagem de recuperação e percentagem de ocorrência de espécies de bactérias diazotróficas sofreram transformação para  $\arcseno\sqrt{x/100}$  e os referentes ao número de esporos sofreram transformação para  $\text{Log}(x+1)$ . Após análise de variância dos dados transformados, os mesmos foram submetidos ao Teste Tukey de médias, ao nível de 5% de probabilidade. Embora não prevista, foi feita análise conjunta de dados em relação ao número de esporos das diferentes localidades, procedendo-se a análise estatística em esquema fatorial (4.2.1). Todas as análises foram efetuadas através do programa MSTATC, com os dados transformados como descrito acima. Estes porém, serão mostrados em sua forma original, quando no texto.

Segue abaixo a análise dos solos utilizados nos experimento da Rede PTA, de acordo com o Laboratório de Solos do CNPAB:

Local	pH	m mol <sub>c</sub> / dm <sup>3</sup>				mg / dm <sup>3</sup>		g / kg	
		Al	Ca+Mg	Ca	Mg	P	K	N	M. O
RJ	4,6	5	34	18	16	1	46	1,2	17,6
MC	6,1	0	88	80	8	40	192	2,1	39,3
GV	5,5	0	37	30	7	3	152	1,2	9,3
ES	6,0	0	37	32	5	11	180	1,1	1,1
PR	4,5	3	56	35	21	2	84	2,3	4,2

Os genótipos utilizados foram escolhidos pelas suas características quanto ao nível de melhoramento imposto para sua obtenção. Segue abaixo suas descrições:

**Asteca Zona da Mata:** material não melhorado, obtido junto a agricultores da região da Zona da Mata Mineira pela Rede PTA, sem maiores informações.

**Caiano de Alegre:** material não melhorado, obtido junto a agricultores da região de Alegre (ES) pela Rede PTA, sem maiores informações.

**Caiano de Sobrália:** material não melhorado, obtido junto a agricultores da região de Sobrália (MG), pela Rede PTA. Apresenta endosperma amarelo do tipo dentado e de ciclo normal e porte médio (altura da planta e da espiga), material com alto potencial produtivo para solos de baixa fertilidade natural.

**Cravinho:** material não melhorado, obtido junto a agricultores de região de Boa Esperança (MG), pela Rede PTA. Apresenta endosperma amarelo do tipo dentado de porte baixo, com médio potencial de produtividade para solos de baixa fertilidade natural.

**Nitrodente:** material parcialmente melhorado, originado do ESALQ VD8. Sofreu 3 ciclos de seleção massal e 1 ciclo de seleção entre e dentro de famílias de irmãos-germanos para eficiência no uso de nitrogênio. É uma população de grãos dentados e semi-dentados, amarelos com segregação para branco e predomínio da Raça Tuxpeño (Machado & Magalhães, 1995).

**XL 560:** híbrido duplo comercial produzido pela BRASKALB. Apresenta grão semi-duro de coloração amarelo alaranjada.

### 3.2- Ensaio 2 - CNPAB

O segundo ensaio foi instalado no campo experimental do CNPAB em 19 de janeiro de 1993. Na área utilizada foram instalados experimentos de consórcio milho-feijão nos anos 1986-1987. Em 1988 foi feito plantio de feijão de porco em toda a área. Após, o solo, um Planossolo, transição das Séries Ecologia-Itaguai, permaneceu em pousio por seis anos até a instalação desse experimento e apresentava os seguintes teores, de acordo com análise do Laboratório de Solos do CNPAB: 0,78 g/kg de N; 12,3 g/kg de matéria orgânica; 5 mg/dm<sup>3</sup> de P; 55 mg/dm<sup>3</sup> de K; 1 m mol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup> de Al; 19 m mol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup> de Ca; 10 m mol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup> de Mg e pH 5,0. Procedeu-se a aplicação de fosfato de Araxá na dosagem de 500 kg.ha<sup>-1</sup> quinze dias antes do plantio e não foram feitas calagem ou aplicação de fertilizantes químicos. Neste ensaio foram utilizados apenas os quatro genótipos citados a seguir e já descritos anteriormente, com base nos resultados obtidos no ensaio da Rede PTA: Caiano de Sobrália (C. Sobrália), Cravinho de Boa Esperança (Cravinho), Nitrodente e XL 560.

Foram feitas avaliações aos 40, 70, 105 e 140 dias após a emergência (DAE), além de uma amostragem do solo antes do plantio, onde avaliou-se o número de esporos e as espécies presentes. Estas datas referem-se aos estágios comumente amostrados ou mencionados como importantes para se estudar as associações envolvidas neste trabalho que são: a floração, a formação de espigas, o enchimento do grão e a fase do grão seco. Aos 40 DAE foram coletadas raízes e colmos de quatro plantas/parcela para avaliação quantitativa da ocorrência de bactérias diazotróficas. Para avaliação da percentagem de colonização das raízes por FMA, foram utilizadas as mesmas raízes. Aos 70 DAE foi feita a colheita das plantas inteiras (4 por parcela). Raízes e colmos foram avaliadas da forma como relatado acima. A parte aérea foi secada em estufa de ventilação forçada à 60°C até peso constante, pesada, moída em moinho de Wiley e analisada para seus teores de N (micro-Kjedhal), P (sulfo-molibdica) e K (fotometria de chama). Aos 105 DAE foi feita a colheita de 4 plantas/parcela para avaliação qualitativa e semi-quantitativas das espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio em raízes, colmos e folhas. Como da forma anterior, as mesmas raízes foram utilizadas para avaliação da taxa de colonização por FMA. Aos 140 DAE, quando as plantas se apresentavam no ponto para colheita de grãos, foi feita a retirada e contagem das espigas, que foram postas para secar ao ar livre. Após, os grãos foram destacados e submetidos ao mesmo tratamento descrito para o material da planta colhido aos 70 DAE. Aos 70 e aos 140 DAE foram feitas avaliações sobre o número de espigas/planta formadas em 25 plantas da linha central em cada parcela. Esta mesma linha foi utilizada para a colheita final de grãos e para a avaliação do peso de grãos/espiga. Espigas que não formaram grãos, não foram consideradas para número de espigas/planta, aos 140 DAE.

Para a análise de variância e teste de médias da produção de matéria seca, de grãos e do conteúdo de N, P e K foram considerados os resultados originais da colheita (peso de 4 plantas por parcela aos 70 DAE e peso de grãos de 25 plantas por parcela aos 140 DAE). Para melhor interpretação dos resultados, os mesmos serão expressos no texto em  $\text{g.planta}^{-1}$ . Da mesma forma, o peso de grãos por espiga foi determinado considerando-se o peso de grãos da parcela e o número de espigas formado na mesma. O número de espigas por planta foi determinado através do número de espigas encontradas nas 25 plantas avaliadas.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com três repetições e quatro tratamentos (genótipos). As parcelas eram constituídas de 5 linhas de 5 metros, espaçadas de 1 metro entre linhas com uma população de 5 plantas.m<sup>2</sup>.

As médias foram submetidas ao Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade, após a análise de variância. Embora não prevista pelo delineamento proposto, foi feita a análise conjunta dos dados em relação a datas de coletas, procedendo-se a análise em esquema fatorial dos dados referentes a percentagem de colonização das raízes por FMA. Todas as análises foram efetuadas através do programa MSTATC e os dados sofreram transformações antes de serem analisados, conforme descrito abaixo, porém, serão mostrados em sua forma original:

Número de bactérias: **Log NMP**

% de incidência de diazotrofos: **arcoseno**  $\sqrt{x/100}$

% de ocorrência de espécies: **arcoseno**  $\sqrt{x/100}$

Número de esporos de FMA: **Log (x+1)**

Densidade relativa de espécies de FMA: **arcoseno**  $\sqrt{x/100}$

% de colonização de raízes por FMA: **arcoseno**  $\sqrt{x/100}$

Por fim, descrevemos abaixo outras unidades utilizadas em nosso trabalho:

% de incidência de diazotrofos:  $\frac{\text{n}^\circ \text{ de frascos com crescimento}}{\text{n}^\circ \text{ total de frascos}} \times 100$

% de ocorrência de espécies:  $\frac{\text{n}^\circ \text{ de frascos da espécie}}{\text{n}^\circ \text{ total de frascos}} \times 100$

Densidade relativa de esporos de FMA:  $\frac{\text{n}^\circ \text{ de esporos da espécie (gênero)}}{\text{n}^\circ \text{ total de esporos da amostra}} \times 100$

Índice de ocorrência de espécies de FMA:  $\frac{\text{n}^\circ \text{ de amostras com a espécie}}{\text{n}^\circ \text{ total de amostras}} \times 100$

### 3.3. Avaliações

#### 3.3.1- Bactérias fixadoras de nitrogênio

Embora tenha sido dada atenção a ocorrência de espécies ainda não descritas ou pouco estudadas (Ex.: Bactéria E), foi enfatizada a ocorrência de bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum*.

A avaliação da ocorrência de bactérias diazotróficas foi feita através de duas metodologias. A primeira, uma análise semi-quantitativa (Baldani, 1987; Pereira et al., 1988 e Fuentes-Ramirez et al, 1993) das bactérias presentes em raízes e colmos. Nesta análise, aqui chamada % de incidência de bactérias, considera-se o número de frascos com crescimento de bactérias, em relação ao número de frascos inoculados. Foram colhidas 3 a 5 raízes de cada planta em cada parcela. Material de colmo foi colhido com o auxílio de furador de rolha (0,5 cm de diâmetro). Material de planta fresco foi levado para o laboratório e procedeu-se a lavagem do mesmo em água corrente, água destilada e água esterilizada. Após, os mesmos foram levados para câmara de fluxo contínuo onde foram flambados em álcool e cortados em pedaços de aproximadamente 5 mm de espessura. De cada amostra (raízes e colmos) foram colocados 6 pedaços em frasquinhos contendo os meios NFb, JNFb e LGI semi-sólido (Döbereiner, 1995). Cuidou-se para que os pedaços ficassem submersos nos meios, para permitir a migração das bactérias para a região de  $pO_2$  adequado, quando se forma película característica do crescimento de *Azospirillum* e *Herbaspirillum*.

A segunda metodologia utilizada foi a do Número Mais Provável (NMP), utilizando a Tabela de McCrady para três repetições, através de diluições seriadas de  $10^{-3}$  até  $10^{-7}$  (Pochon & Tardieux, 1962). Esta análise tem uma precisão maior que a descrita anteriormente.

Foram feitas avaliações em raízes lavadas (RL: água de torneira para retirada de solo aderido, água destilada e água esterilizada), raízes esterilizadas (RE: cloramina T 1% por 3 minutos e lavagens sucessivas com tampão fosfato e água esterilizada), colmos e folhas lavados em água esterilizada. Após o isolamento e caracterização das espécies presentes, foi analisada a % de ocorrência das mesmas.

Todos os passos relativos as contagem foram realizados em meio NFb, JNFb e LGI semi-sólido. A inoculação dos frasquinhos (5 ml de meio) foi de 0.1 ml quando do NMP ou pedaços, e os mesmos foram mantidos à 32°C até a contagem que ocorreu de 5 a 7 dias após a mesma.

O exame microscópico feito aos seis dias de incubação em meio NFb já distingue *A. lipoferum*, das outras espécies. Os frascos das mais altas diluições das contagens e da % de incidência onde predominava *A. lipoferum* são repicados para meio NFb-glucose, para confirmação da espécie. Os outros materiais são repicados para novo meio NFb-malato,

mantidos a 32° C por 36-48 horas e riscado em placa (meio sólido) com os mesmos meios utilizados na contagem, com dose de arranque de N na forma de extrato de levedura (25 mg.l<sup>-1</sup>). Após 5 a 7 dias, a 32° C, colônias foram retiradas e colocadas em frasquinhos contendo os meios nos quais haviam sido isolados e riscados em placas contendo meio rico (meio batata) para verificação de pureza, e estocados.

A análise taxonômica dos gêneros e espécies encontradas foram realizadas considerando aspectos morfológicos (pleomorfismo) e de utilização de glucose para *A. lipoferum*. Para identificação de *A. brasilense* e *H. seropedicae* foi utilizada a metodologia descrita por Li e Macrae (1991) pela técnica de ELISA indireta, sendo utilizadas “type strains” para produção de soro. Maiores detalhes sobre os meios utilizados ou procedimentos de isolamento estão relatados em Döbereiner (1995).

Os dados referentes a quantificação total e das espécies de bactérias que ocorreram, foram transformados antes de proceder-se a análise estatística, e serão apresentados na sua forma original.

### 3.3.2- Fungos micorrízicos

De cada amostra foram utilizados 50 cm<sup>3</sup> de solo, para extração de esporos através de peneiramento úmido e decantação em sacarose 40 %, como descrito por Gerdermann e Nicolson (1963). A contagem foi feita em placas de anéis concêntricos ao microscópio estereoscópio.

A avaliação da densidade relativa das espécies foi feita após a identificação das mesmas (Schenck e Peres, 1988), sendo esta calculada com base no número de esporos da espécie em relação ao número total de esporos.

A percentagem de colonização das raízes por FMA foi feita após coloração das mesmas pelo método descrito por Koske e Gemma (1989), utilizando placas quadriculadas e considerando a percentagem de pedaços de raízes colonizadas em relação ao número total de raízes da amostra (entre 100 e 150), conforme descrito por Giovannetti e Mosse (1980).

Os dados referentes ao número de esporos, densidade relativa das espécies e colonização de raízes foram analisados estatisticamente pelo Teste Tukey de média (  $p < 0,05$ ), após a análise de variância. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa MSTATC, como já descrito em 3.1 e 3.2..

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Bactérias fixadoras de nitrogênio

#### 4.1.1. Ensaio Rede PTA

Não detectou-se diferenças significativas na percentagem de ocorrência de bactérias diazotróficas em raízes dos diferentes genótipos (Tabela 1). Da mesma forma, não foram detectadas diferenças na % de ocorrência das espécies de *A. lipoferum* e *A. brasilense* (Tabela 2). Baldani (1984), já alertava sobre a pequena diferença encontrada na abundância das espécies de *Azospirillum* isolados de milho, sorgo e arroz.

*A. amazonense* foi encontrada entre 50 e 67 % das amostras de raízes e entre 42 e 57 % de colmo apenas nos genótipos Nitrodente e XL 560 acompanhando os resultados obtidos para *A. lipoferum* e *A. brasilense* (Tabela 1). Todas as amostras de raízes e colmo que mostraram crescimento positivo em meio LGI eram da espécie *A. amazonense*. Foi observada uma maior incidência de frascos positivos em meio JNFb (*A. lipoferum* + *A. brasilense*), principalmente de material oriundo de raízes (Tabela 1). Por outro lado, os genótipos Nitrodente e XL 560 mantiveram valores de isolados do colmo significativamente maiores que os demais genótipos. Esta diferença não foi detectada nos outros materiais, independente dos meios utilizados (Tabela 1).

Da análise mostrada na Tabela 1, foram selecionados os frascos com crescimento positivo, que após serem submetidos ao processo de purificação em laboratório, foram identificados de acordo com os testes realizados as diferentes espécies presentes (Döbereiner, 1995). Foi feita uma tentativa para o isolamento e possível identificação de uma variante natural de *A. lipoferum* (que usa sacarose e parece colonizar preferencialmente o interior das plantas) com morfologia das células em forma de minhoca e colônias em forma de estrela (Falk et al, 1986) em 25 frascos (23% das amostras de *A. lipoferum*) dentre os 108 amostrados. (Tabela 2).

TABELA 1. Percentagem de incidência de *Azospirillum spp* em raízes e colmos de 6 genótipos de milho coletados aos 120 DAE. Queimados (RJ). Médias de 18 frascos.

Genótipo	Meio NFb		Meio JNFb		Meio LGI	
	<i>Azospirillum brasilense</i>	+	<i>Azospirillum lipoferum</i>		<i>A. amazonense</i>	
	raízes	colmo	raízes	colmo	raízes	colmo
Asteca	57 a	8 b	92 a	8 b	50 a	0 b
C. Alegre	67 a	0 b	100 a	0 b	50 a	0 b
C. Sobrália	100 a	0 b	100 a	0 b	58 a	0 b
Cravinho	83 a	0 b	92 a	0 b	50 a	0 b
Nitrodente	92 a	67 a	100 a	33 ab	50 a	42 ab
XL 560	83 a	67 a	100 a	83 a	67 a	57 a
CV (%)	20.1	71.6	22.2	82.7	49.0	108.8

Dados da coluna seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste Tukey.

Nesta época, já havia um certo interesse acerca desta bactéria. Sua morfologia é muito característica, porém, o pleomorfismo de *A. lipoferum*, presente na amostra, sempre dificultou sua identificação, na ausência de meios mais específicos (Pereira, observações pessoais). Embora não tenha permitido análise estatística, os dados sobre a ocorrência desta bactéria confirmam a abundância de *A. lipoferum* e *A. brasilense* nos genótipos Nitrodente, XL 560 e Asteca.

TABELA 2. Percentagem de ocorrência de *Azospirillum spp* em raízes e colmos de 6 genótipos de milho coletados aos 120 DAE. Queimados (RJ). Médias de 36 frascos (Meios NFb + JNFb).

Genótipo	<i>A. brasilense</i>		<i>A. lipoferum</i>		<i>A. lipoferum (minhoca)</i>	
	raízes	colmo	raízes	colmo	raízes	colmo
Asteca	38	67	62	33	0	5
C. Alegre	47	0	53	0	5	0
C. Sobrália	57	0	43	0	22	0
Cravinho	35	0	65	0	16	0
Nitrodente	77	23	23	77	16	28
XL 560	45	49	55	51	28	16

Poucos dados estão disponíveis na literatura sobre a ocorrência desta bactéria, que forma colônia-estrela e tem forma de minhoca, (Falk et al, 1986). O interesse pela mesma deve-se agora a sua maior detecção do interior das plantas e ao novo enfoque dado às bactérias diazotróficas endofíticas ou que habitem preferencialmente o ambiente endófito (Döbereiner, 1992 a; b).

De forma geral, os genótipos mais trabalhados geneticamente (Nitrodente e XL 560) mostraram maiores percentagens de presença de bactérias no interior das plantas. O meio JNFb, embora desenvolvido para *H. seropedicae* spp parece ser o mais recomendado em trabalhos que visem a contagem de bactérias diazotróficas, já que propiciou o isolamento do maior número de isolados de *A. lipoferum* e *A. brasilense*, principalmente de ambiente endofítico. Dos 25 isolados de bactéria 'minhoca', 20 foram isolados em meio JNFb, sendo 9 provenientes do colmo.

#### 4.1.2. Ensaio CNPAB

O resultado das análises feitas aos 40 e 70 dias após a emergência das plantas (DAE) em raízes lavadas (RL), raízes esterilizadas (RE) e colmos para avaliação da ocorrência de bactérias diazotróficas e da % de distribuição relativa as diferentes espécies do gênero *Azospirillum* estão apresentados na Tabela 3. Estas foram as datas estabelecidas por Magalhães, Patriquin e Döbereiner (1979) como as de maior incidência de diazotrofos. Podemos observar uma menor presença de bactérias em raízes lavadas aos 40 DAE no genótipo XL 560, seguido de Caiano de Sobrália. Na colheita realizada aos 70 DAE, não foi possível observar diferenças entre os genótipos em relação ao número de bactérias diazotróficas presentes nas várias partes do vegetal amostradas ou entre os genótipos avaliados (Tabela 3).

TABELA 3. Contagem do número de bactérias diazotróficas (NMP) em raízes lavadas (RL), raízes esterilizadas (RE) e colmos, avaliados aos 40 e 70 DAE em 4 genótipos de milho. Médias de 3 repetições.

Genótipos	40 DAE			70 DAE		
	Log do número de células.g <sup>-1</sup>			de material de planta fresco*		
	RL	RE	Colmo	RL	RE	Colmo
C. Sobrália	6,704 ab	5,273 a	4,757 a	6,668 a	6,224 a	5,290 a
Cravinho	6,922 a	6,041a	4,472 a	6,987 a	6,259 a	4,703 a
Nitrodente	7,076 a	5,972 a	4,258 a	7,010 a	6,076 a	4,377 a
XL 560	6,151 b	5,235a	3,784 a	7,031 a	5,364 a	5,065 a
CV (%)	3,9	9,0	12,6	7,6	12,6	17,7

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste Tukey.

\*Os valores são os mais altos encontrados em meios NFb ou JNFb dos frascos da contagem.

Por outro lado, não foi possível estabelecer diferenças na % de ocorrência das espécies de *Azospirillum lipoferum* e *A. brasilense* presentes nos frascos da contagem, entre os genótipos coletados aos 40 DAE (Tabela 4). Porém observa-se uma tendência de maior ocorrência da espécie *A. lipoferum* no colmo e de *A. brasilense* em raízes esterilizadas.

TABELA 4. Percentagem de ocorrência de *A. lipoferum* e *A. brasilense* avaliado aos 40 DAE de 4 genótipos de milho. Médias de 24 frascos\*

Genótipos	<i>A. lipoferum</i>			<i>A. brasilense</i>		
	RL	RE	Colmo	RL	RE	Colmo
C. Sobrália	43	22	56	57	78	44
Cravinho	58	42	67	42	58	33
Nitrodente	67	10	100	33	90	0
XL 560	72	53	50	28	47	50

RL e RE. Raízes lavadas e raízes esterilizadas, respectivamente.

\*Frascos das mais altas diluições das contagens em meio NFb e JNFb.

Na colheita realizada aos 70 DAE tivemos um problema com os meios de cultura (vários usuários tiveram problemas semelhantes, nesta época). O meio parece ter favorecido a maior ocorrência de *A. lipoferum*, já que esta espécie foi isolada da maioria dos frascos que apresentavam crescimento quando repicados para novo meio (Tabela 5). Isto não surpreende por tratar-se de uma planta  $C_4$ , que como já estabelecido por Baldani e Döbereiner (1982) é colonizada por *A. lipoferum*, ao passo que plantas com via fotossintética  $C_3$  são colonizadas preferencialmente por *A. brasilense*. Se algum fator do meio de cultivo reduziu a ocorrência da espécie *A. brasilense* aos 70 DAE, o mesmo não ocorreu com *A. lipoferum*, já que a mesma estava presente em maior número nesta época, principalmente no colmo em todos os genótipos, à exceção de Caiano de Sobrália (Tabela 5).

TABELA 5. Percentagem de ocorrência de *A. lipoferum* e *A. brasilense* avaliado aos 70 DAE de 4 genótipos de milho. Médias de 12 frascos\*.

Genótipos	<i>A. lipoferum</i>			<i>A. brasilense</i>		
	RL	RE	Colmo	RL	RE	Colmo
C. Sobrália	0	0	0	0	0	0
Cravinho	0	100	65	0	0	35
Nitrodente	100	100	100	0	0	0
XL 560	0	0	100	0	0	0

\*Frascos das diluições mais altas das contagens em meio NFb.

RL e RE. Raízes lavadas e raízes esterilizadas, respectivamente.

Os resultados da colheita efetuada aos 105 DAE para avaliar a ocorrência de bactérias diazotróficas nas diferentes partes da planta e incluindo bactérias ainda não caracterizadas ou pouco estudadas na cultura do milho estão mostrados na Tabela 6. Houve um maior isolamento de bactérias nos genótipos Nitrodente e XL 560 em amostras de folhas e colmos, o que não ocorreu em raízes lavadas ou esterilizadas, já que não foi possível detectar diferenças entre os genótipos estudados, embora sua recuperação tenha sido sempre acima de 75%, (dados não mostrados).

TABELA 6. Incidência de bactérias diazotróficas em folhas e colmos de 4 genótipos de milho aos 105 DAE. Médias de 3 repetições (36 frascos).

Genótipos	% de incidência	
	Folhas	Colmos
Caiano de Sobrália	33 ab	33 b
Cravinho de B. Esperança	11 b	17 b
Nitrodente	50 a	78 a
XL 560	47 a	66 ab
CV (%)	27,3	27,0

Em relação à presença de diferentes espécies de *Azospirillum* em raízes lavadas e esterilizadas não se notou predomínio de nenhuma espécie. Não houve também uma grande ocorrência de *Herbaspirillum seropedicae* nestes materiais, já que a mesma foi detectada apenas em poucas amostras de folhas e colmos dos genótipos Cravinho e Nitrodente (Tabela 7). Como mencionado para o Ensaio da Rede PTA, Baldani (1984), já observara a não predominância de uma espécie em várias culturas, sendo as espécies detectadas em todos os materiais amostrados em níveis elevados.

TABELA 7. Percentagem de recuperação de espécies de bactérias diazotróficas de 4 genótipos de milho avaliada aos 105 DAE. Médias de 18 frascos.

Genótipos	<i>A. lipoferum</i>				<i>A. brasilense</i>				<i>H. seropedicae</i>			
	RL	RE	F	C	RL	RE	F	C	RL	RE	F	C
Caiano de Sobrália	50	60	0	0	50	40	100	100	0	0	0	0
Cravinho	70	100	0	0	30	0	50	0	0	0	50	0
Nitrodente	20	35	50	0	80	65	50	50	0	0	0	20
XL 560	0	30	0	50	0	70	0	50	0	0	0	0

RL, RE, F e C : materias de raízes lavadas, raízes esterilizadas, folhas e colmos frescos, respectivamente.

Em relação a presença de outras bactérias menos estudadas, ou não descritas, foi possível obter alguns isolados de *Burkholderia cepacia* e, mais ainda, um isolado (BcB2) que posteriormente foi confirmado como sendo do gênero *Burkholderia*, porém não da espécie *B. cepacia* (Kirckhhof et al, 1995). O isolado BcB2 foi isolado de raízes do genótipo Cravinho em meio JNFb, mas não dos demais genótipos. Este isolado possivelmente pertence a nova espécie do gênero *Burkholderia*, que está sendo caracterizada. Vários isolados pertencentes a nova espécie de *Burkholderia* já foram obtidos de outras culturas, como arroz, batata-doce e cana-de-açúcar (Oliveira, 1992 ; Döbereiner e Baldani, 1995; Balota, 1994). Esta é a primeira descrição da ocorrência desta bactéria na cultura do milho. Um novo meio, denominado JMV, vem sendo desenvolvido para o crescimento preferencial desta bactéria e algumas características já foram relatadas (Döbereiner e Baldani, 1995). Entretanto, o isolado (BcB2) não apresentou alta similaridade para a nova espécie de *Burkholderia*, conforme estabelecido por Kirckhhof et al (1995). Portanto pode ser uma nova espécie dentro do gênero. Mais isolados são necessários, para que estudos nesse sentido sejam efetuados.

## **4. 2. Fungos Micorrízicos Arbusculares**

### **4.2.1. Ensaio 1 - Rede PTA**

Como já mencionado no Capítulo 3, os materiais utilizados em nosso estudo (solo, raiz e colmo) foram obtidos de um experimento de rede, executado pela AS-PTA em convênio com o CNPAB. O experimento já se encontrava em andamento e tivemos auxílio externo para a coleta de solo nos diferentes locais, à exceção de Queimados (RJ) onde foi possível obter-se homogeneização e controle na coleta de material para análises microbiológicas que permitissem a análise estatística dos dados. Este ensaio priorizou o estudo da ocorrência de bactérias diazotróficas nos diferentes genótipos, aproveitando-se da proximidade geográfica, que permitiu acessar pequena quantidade de raízes e colmos frescos, além de pequena quantidade de solo. Não foi obtido material de raízes suficiente para a determinação da percentagem de colonização de raízes FMA. O transporte e armazenamento inadequados e o tempo decorrido da coleta à análise do solo, parecem ter sido responsáveis pela má qualidade apresentada pelos esporos de FMA, o que não permitiu a análise taxonômica dos mesmos.

Verificaram-se diferenças genotípicas para número de esporos aos 120 DAE. O genótipo XL 560 apresentou número de esporos significativamente menor que Caiano de Sobralia e Cravinho no ensaio do Rio de Janeiro (Tabela 8). Os dados referentes ao ensaio instalado no Espírito Santo também foram significativamente mais baixos para o genótipo XL 560, quando analisados pelo Teste Duncan, ao mesmo nível de probabilidade (não mostrado). Isto reforça os dados da contagem de esporos desta localidade (RJ), onde o cultivo contínuo de mandioca, uma planta sabidamente micotrófica, parece ter sido responsável pelo número mais elevado de esporos na área do ensaio (Tabela 8).

TABELA 8. Densidade de esporos em 5 localidades nos Estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná e Rio de Janeiro, detectados em 6 genótipos de milho, aos 120 dias após a emergência. Médias de três repetições.

Genótipos	Número de esporos / 50 cm <sup>3</sup>				
	Paraná	E. Santo	M.G. (GV)	M.G. (MC)	RJ
Asteca	173	249	371	203	435 ab
Caiano de Alegre	175	52	168	96	448 ab
C.de Sobrália	220	175	224	71	623 a
Cravinho	121	104	172	247	600 a
Nitrodente	130	85	211	146	394 ab
XL 560	155	29	195	97	213 b
Médias dos locais	162 b	116 b	223 ab	143 b	452 a

Letras iguais na coluna referem-se as médias de genótipos e não diferem entre si pelo Teste Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

Letras iguais na linha referem-se as médias de locais e não diferem entre si pelo Teste Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

Conforme descrito em 3.1, foi realizada análise em esquema fatorial, considerando local como um dos fatores. Os dados do Teste Tukey de médias ao nível de 5 % estão apresentados na Tabela 8, nas respectivas médias dos locais. Pode-se inferir que o melhor controle dado à coleta efetuada no ensaio do Rio de Janeiro tenha sido responsável pelo melhor ajuste dos dados, permitindo detectar diferença significativa entre os genótipos, já que a análise química dos diferentes solos não permitiu nenhuma conclusão definitiva. Mesmo assim, os resultados permitiram a escolha de materiais contrastantes: Caiano de Sobrália e Cravinho mostraram número de esporos elevados nos ensaios conduzidos no Rio de Janeiro e no Espírito Santo; Nitrodente e XL 560 obtiveram os mais altos valores em relação a presença de bactérias no interior da planta e XL 560 apresentava o menor número de esporos no Rio de Janeiro e no Espírito Santo, como mostrado nas Tabelas 1 e 8. Esses materiais foram utilizados no ensaio seguinte, conduzido no CNPAB.

## 4.2.2. Ensaio CNPAB

### 4.2.2.1. Colonização de raízes por FMA

Segundo Sieverding (1991) a percentagem de colonização de raízes não deve ser interpretada como a taxa de atividade do fungo. Porém, sua taxa máxima de infecção, quando as taxas de crescimento de raízes e de colonização pelo fungo são constantes, indica a infectividade da população fúngica. Em nosso trabalho o genótipo que mais se aproximou desta premissa e parece ter se beneficiado foi o Nitrodente (Figura 1). Podemos notar que as maiores variações na percentagem (%) de colonização de raízes ocorreram no estágios inicial e final do crescimento das plantas. Diferenças significativas foram detectadas aos 40 DAE (Figura 1), sugerindo que esta data deve ser considerada para trabalhos futuros. Em contraste, os resultados obtidos aos 70 DAE mostraram níveis de colonização muito similares.

Em relação à colonização de raízes e sua flutuação ao longo do tempo, procedeu-se a análise conjunta de dados (conforme descrito em 3.2), considerando data de colheita como um dos fatores. O genótipo XL 560 foi o único a ter seus valores de colonização alterados significativamente durante o período amostrado, aumentando da coleta efetuada aos 40 DAE para a coleta efetuada aos 70 DAE, e desta para a coleta efetuada aos 105 DAE (Figura 1). Cravinho também sofreu alterações durante o ciclo da planta, oposta a XL 560, porém estas não foram detectadas, quando submetidas ao Teste Tukey de médias ao nível de 5 % de probabilidade.

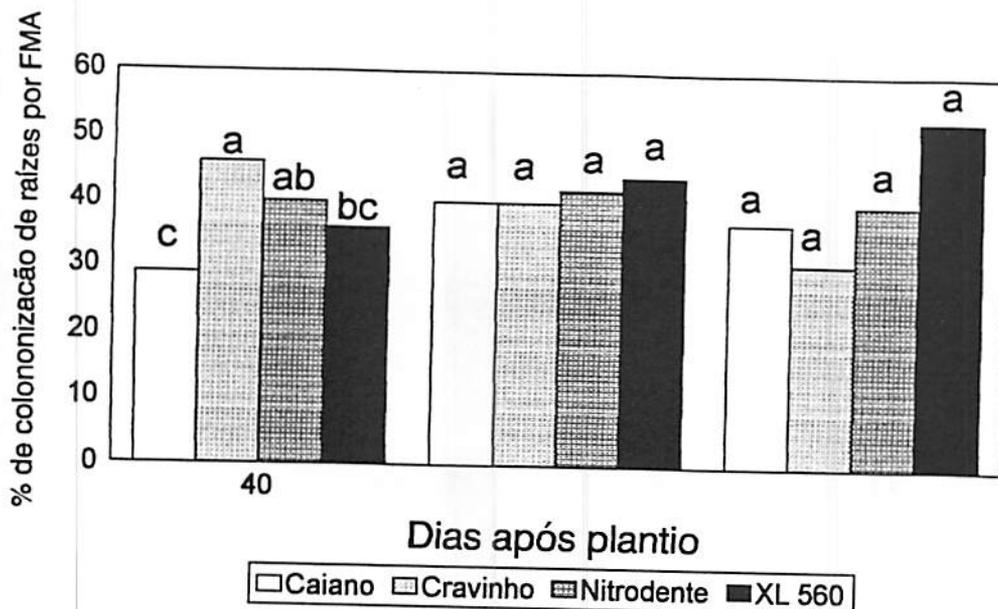


FIGURA 1. Percentagem de colonização de raízes por FMA durante o ciclo vegetativo de quatro genótipos de milho. Letras iguais na mesma data não diferem entre si pelo Teste Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

Mcgonigle (1987) enfatiza que a infecção contínua das raízes sem um benefício à planta, leva ao estabelecimento de uma relação parasítica. Embora esta seja uma possível explicação ou resposta para o baixo desempenho na produtividade de XL 560, devemos considerar outros fatores, como por exemplo a taxa de crescimento das raízes durante o ciclo da planta. Segundo Dodd e Jefries (1986), existe uma situação que marca o crescimento de raízes excedendo a capacidade do fungo infectá-las, decrescendo a fração infectada, durante o período favorável ao crescimento da planta. Isto pode ter ocorrido com XL 560 e Caiano de Sobrália no início do experimento.

Na colheita aos 40 DAE, o genótipo Caiano de Sobrália teve a menor taxa de colonização de raízes, diferindo estatisticamente de Cravinho e Nitrodente, embora com valores abaixo também de XL 560. Nas demais épocas todos os genótipos apresentaram o mesmo nível de colonização de raízes. O cultivar Nitrodente manteve o mesmo nível de colonização de raízes (40 %) durante todo o ciclo da planta.

O genótipo Cravinho, que aos 40 DAE mostrava a maior % de colonização de raízes por FMA apresentou a menor % de colonização aos 105 DAE. Embora esta queda não tenha sido estatisticamente significativa, os dados de produção de massa e grãos (discutidos em 4.3) mostram que o mesmo foi afetado negativamente na sua produção de grãos em relação a produção de massa aos 70 DAE.

O genótipo XL 560, ao inverso de Cravinho, teve seus valores referentes a % de colonização de raízes aumentados significativamente da coleta aos 40 DAE para a coleta aos 105 DAE, mostrando da mesma forma o efeito negativo desta variação na % de colonização, na produção de grãos. Isto torna-se mais claro quando consideramos sua produção de massa aos 70 DAE, sua produção de grãos e mais acentuadamente sua produção de espigas/planta ou peso de grãos por espiga (discutidos em 4.3)

Diferentemente do demonstrado por Gavito e Varela (1993), o genótipo XL 560 apresentou a maior percentagem de colonização de raízes aos 140 DAE. O genótipo Cravinho teve sua maior percentagem de colonização de raízes foi início do ciclo vegetativo, decrescendo na senescência das plantas, como demonstrado por estes autores. Atribuímos a não detecção da diferença na % de colonização das raízes dos 40 DAE para os 105 DAE em Cravinho, à grande variabilidade deste material, ao contrário de XL 560, híbrido duplo, homogêneo, que variando na mesma amplitude de resposta teve esta variação detectada já aos 70 DAE, quando a variação em relação à coleta efetuada aos 40 DAE era de 8 % na taxa de colonização (Figura 1). Os genótipos Cravinho e XL 560 foram os que apresentaram maior variação da coleta efetuada aos 70 DAE para a efetuada aos 105 DAE, mostrando tendências inversas, no mesmo nível de alteração (9 % em valores absolutos). A variação sofrida por estes materiais da coleta aos 40 DAE para a coleta aos 105 DAE também foi inversa e no mesmo nível (15 %). Embora as tendências destes genótipos tenham sido inversas em relação à colonização das raízes, os mesmos sofreram pressões marcantes em sua produção, sendo afetados negativamente por este alto nível de alteração ao final do ciclo. Considerando que todos os genótipos tiveram os mesmos níveis de disponibilidade de nutrientes, que Nitrodente obteve produção razoável e que Cravinho não tem grandes exigências nutricionais, diferentemente de Cravinho, pode-se inferir que a associação tornou-se parasítica nos genótipos XL 560 e Cravinho.

#### 4.2.2. Ocorrência de esporos de FMA

A densidade total de esporos no solo antes (inicial) e depois do cultivo não foi influenciada pelos genótipos de milho em nenhuma época de avaliação (Tabela 11). Entretanto, foi observada a presença de *Acaulospora* sp e de *Entrophospora colombiana* SPAIN & SCHENCK apenas no solo antes do plantio (inicial). A detecção de *Glomus geosporum* (NICOLSON & GERDERMANN) WALKER e *Scutellospora nigra* (REDHEAD) WALKER

& SANDER foi esparsa. Podemos notar que *Scutellospora weresubiae* KOSKE & WALKER e *Glomus multisubstensum* MUKERJI, BHATTACHARJEE & TEWARI ocorreram com índice de ocorrência elevado (Tabela 10), porém em baixo número (Tabela 9).

TABELA 9- Densidade total ( N: nº de esporos.50 cm<sup>-3</sup> ) e densidade relativa ( DR ) de esporos de espécies de FMA durante o ciclo vegetativo de quatro genótipos de milho. Médias de três repetições.

Genótipo	FMA	Época de avaliação							
		Inicial		70 DAE		110 DAE		140 DAE	
		N	DR	N	DR	N	DR	N	DR
C A I A N O	<i>Acaulospora</i> sp (n.i.)	3	2	0	0	0	0	0	0
	<i>Entrophospora colombiana</i>	30	17	0	0	0	0	0	0
	<i>Glomus etunicatum</i>	80	39	0	0	18	25	39	34
	<i>Glomus geosporum</i>	0	0	<1	<1	0	0	<1	<1
	<i>Glomus macrocarp.</i>	19	12	2	4	30	35	51	56
	<i>Glomus multisubst.</i>	4	3	3	6	0	0	2	2
	<i>Glomus sp (n.i.)</i>	3	1	21	42	0	0	0	0
	<i>Scutellospora heterogama</i>	7	5	17	34	23	26	10	8
	<i>Scutellospora nigra</i>	3	4	0	0	0	0	0	0
<i>Scutellospora weresubiae</i>	1	<1	6	13	2	3	3	3	
C R A V I N H O	<i>Acaulospora</i> sp (n.i.)	7	6	0	0	0	0	0	0
	<i>Entrophospora colombiana</i>	13	11	0	0	0	0	0	0
	<i>Glomus etunicatum</i>	45	37	0	0	30	24	29	31
	<i>Glomus geosporum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Glomus macrocarp.</i>	21	25	8	12	50	46	47	49
	<i>Glomus multisubst.</i>	5	4	8	17	2	1	4	5
	<i>Glomus sp (n.i.)</i>	1	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Scutellospora heterogama</i>	2	2	22	45	21	18	7	7
	<i>Scutellospora nigra</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Scutellospora weresubiae</i>	3	3	6	13	6	5	2	2	
N I T R O D E N T E	<i>Acaulospora</i> sp (n.i.)	7	9	0	0	0	0	0	0
	<i>Entrophospora colombiana</i>	7	8	0	0	0	0	0	0
	<i>Glomus etunicatum</i>	24	28	0	0	24	21	24	23
	<i>Glomus geosporum</i>	<1	<1	0	0	0	0	0	0
	<i>Glomus macrocarp.</i>	24	33	7	14	33	31	30	37
	<i>Glomus multisubst.</i>	2	3	1	<1	1	1	8	8
	<i>Glomus sp (n.i.)</i>	0	0	20	23	0	0	0	0
	<i>Scutellospora heterogama</i>	7	9	29	48	36	34	21	20
	<i>Scutellospora nigra</i>	0	0	0	0	<1	<1	0	0
<i>Scutellospora weresubiae</i>	0	0	2	4	5	5	2	2	
X L 5 6 0	<i>Acaulospora</i> sp (n.i.)	10	12	0	0	0	0	1	<1
	<i>Entrophospora colombiana</i>	12	10	0	0	0	0	0	0
	<i>Glomus etunicatum</i>	29	28	23	41	25	33	11	27
	<i>Glomus geosporum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Glomus macrocarp.</i>	23	33	11	22	30	40	17	38
	<i>Glomus multisubst.</i>	<1	1	3	5	0	0	4	7
	<i>Glomus sp (n.i.)</i>	<1	1	<1	<1	0	0	0	0
	<i>Scutellospora heterogama</i>	1	3	6	12	12	14	4	13
	<i>Scutellospora nigra</i>	0	0	0	0	1	1	0	0
<i>Scutellospora weresubiae</i>	2	2	5	9	5	7	1	3	

n.i. : não identificada a espécie ou espécies encontradas

TABELA 10- Índice de ocorrência das espécies de FMA indígenas durante o ciclo vegetativo de quatro genótipos de milho. Médias de três repetições.

Genótipo	FMA	Época de avaliação			
		Inicial	70 DAE	105 DAE	140 DAE
C A I A N O de Sobrália	<i>Acaulospora</i> sp (n.i.)	100	0	0	0
	<i>Entrophospora colombiana</i>	100	0	0	0
	<i>Glomus etunicatum</i>	100	0	100	100
	<i>Glomus geosporum</i>	0	33	0	33
	<i>Glomus macrocarpum</i>	100	33	100	100
	<i>Glomus multisubst.</i>	67	67	0	67
	<i>Glomus</i> sp (n.i.)	33	100	0	0
	<i>Scutellospora heterogama</i>	100	100	100	100
	<i>Scutellospora nigra</i>	67	0	0	0
	<i>Scutellospora weresubiae</i>	67	100	100	100
C R A V I N H O	<i>Acaulospora</i> sp (n.i.)	67	0	0	0
	<i>Entrophospora colombiana</i>	67	0	0	0
	<i>Glomus etunicatum</i>	100	0	100	100
	<i>Glomus geosporum</i>	0	0	0	0
	<i>Glomus macrocarpum</i>	100	67	100	100
	<i>Glomus multisubst.</i>	100	100	33	67
	<i>Glomus</i> sp (n.i.)	33	0	0	0
	<i>Scutellospora heterogama</i>	100	100	100	100
	<i>Scutellospora nigra</i>	0	0	0	0
	<i>Scutellospora weresubiae</i>	100	100	100	67
N I T R O D E N T E	<i>Acaulospora</i> sp (n.i.)	67	0	0	0
	<i>Entrophospora colombiana</i>	33	0	0	0
	<i>Glomus etunicatum</i>	100	0	100	100
	<i>Glomus geosporum</i>	33	0	0	0
	<i>Glomus macrocarpum</i>	100	100	100	100
	<i>Glomus multisubst.</i>	33	33	33	100
	<i>Glomus</i> sp (n.i.)	0	100	0	0
	<i>Scutellospora heterogama</i>	100	100	100	100
	<i>Scutellospora nigra</i>	0	0	33	0
	<i>Scutellospora weresubiae</i>	0	100	100	67
X L 5 6 0	<i>Acaulospora</i> sp (n.i.)	100	0	0	33
	<i>Entrophospora colombiana</i>	67	0	0	0
	<i>Glomus etunicatum</i>	100	100	100	100
	<i>Glomus geosporum</i>	0	0	0	0
	<i>Glomus macrocarpum</i>	100	100	100	100
	<i>Glomus multisubst.</i>	33	67	0	67
	<i>Glomus</i> sp (n.i.)	33	33	0	0
	<i>Scutellospora heterogama</i>	33	100	100	100
	<i>Scutellospora nigra</i>	0	0	67	0
	<i>Scutellospora weresubiae</i>	67	100	100	67

n.i. : não identificada a espécie ou espécies encontradas.

TABELA 11 - Número total de esporos de FMA durante o ciclo vegetativo de quatro genótipos de milho. Médias de três repetições.

Genótipos	Nº de esporos/50 cm <sup>3</sup>			
	Inicial	70 DAE	105 DAE	140 DAE
C. Sobrália	175 a	49 a	81 a	114 a
Cravinho	110 a	50 a	114 a	95 a
Nitrodente	79 a	66 a	106 a	104 a
XL 560	87 a	53 a	77 a	42 a
CV (%)	44,4	36,6	28,9	31,7

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste Tukey.

A densidade relativa de esporos de *Glomus etunicatum* BECKER & GERDEMANN., *Glomus macrocarpum* Tul. & Tul., *Scutellospora heterogama* (NICOL. & GERD.) WALKER & SANDERS e seus gêneros, foi objeto de análise individual e são mostradas nas Tabelas 13, 14 e 16 respectivamente. Estes fungos mostram ser influenciados pelos diferentes genótipos durante o ciclo das plantas. Embora tenha sofrido um forte ajuste aos 70 DAE, o número total de esporos não variou em relação ao tempo ou entre genótipos (Tabela 11).

O número de esporos de espécies pertencentes ao gênero *Glomus*, que na amostra de solo antes do plantio (inicial) mostrava uma grande diferença entre as repetições ( $p < 0.07$ ) sofreu um ajustamento aos 70 e 105 DAE. Este ajuste foi promovido pela planta, levando a serem detectadas diferenças em relação aos genótipos aos 140 DAE neste parâmetro (\*XL 560,) como mostrado na Tabela 12.

TABELA 12. Número de esporos do gênero *Glomus* durante o ciclo vegetativo de 4 genótipos de milho. Médias de 3 repetições.

Genótipos	Nº de esporos/50 cm <sup>3</sup>			
	Inicial	70 DAE	105 DAE	140 DAE
C. Sobrália	106 a	26 a	48 a	93 a
Cravinho	72 a	16 a	82 a	80 a
Nitrodente	51 a	28 a	58 a	71 a
XL 560	53 a	38 a	55 a	32 a*
CV (%)	43,4	66,7	27,4	35,3

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste Tukey.

\*  $p < 0.06$

TABELA 13. Número de esporos da espécie *Glomus etunicatum* durante o ciclo vegetativo de 4 genótipos de milho.

Genótipos	Nº de esporos/50 cm <sup>3</sup>			
	Inicial	70 DAE	105 DAE	140 DAE
C. Sobrália	80 a	0 b	18 a	39 a
Cravinho	45 a	0 b	30 a	29 a
Nitrodente	24 a	0 b	24 a	24 a
XL 560	29 a	23 a	25 a	11 a
CV (%)	25,1	53,3	14,4	18,2

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste Tukey. Médias de 3 repetições.

A Tabela 13 mostra um efeito do genótipo XL 560 na população da espécie *Glomus etunicatum* durante o experimento. A variação na densidade de esporos da espécie *Glomus macrocarpum* acompanhou a de *G. etunicatum*, porém não foi detectada pela análise estatística (Tabela 14).

Os dados apresentados na Tabela 13 (principalmente) e Tabela 14 sugerem que espécies que tiveram seu número de esporos reduzidos em relação à coleta inicial podem estar colonizando as raízes, já que após sua germinação os esporos não estariam sendo detectados como tal. Esta variação sazonal na germinação dos esporos parece ser responsável pela baixa relação cronológica encontrada entre abundância de esporos e infectividade, conforme sugerido por Gemma e Koske (1988). No caso de *G. etunicatum*, parece que a germinação dos esporos não foi permitida ou influenciada por XL 560, já que o mesmo não mostrou menor número de esporos aos 105 DAE, a exemplo dos demais, ou seja, ao que parece foi indiferente à presença dos propágulos micorrízicos.

TABELA 14. Número de esporos da espécie *Glomus macrocarpum* durante o ciclo vegetativo de 4 genótipos de milho.

Genótipos	Nº de esporos/50 cm <sup>3</sup>			
	Inicial	70 DAE	105 DAE	140 DAE
C. Sobrália	19 a	2 a	30 a	51 a
Cravinho	21 a	8 a	50 a	47 a
Nitrodente	34 a	7 a	33 a	40 a
XL 560	23 a	11 a	30 a	17 a
CV (%)	16,8	69,4	8,0	15,1

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste Tukey. Médias de 3 repetições.

Enquanto na coleta inicial (antes do plantio) o número de esporos das espécies *G. etunicatum* e *G. macrocarpum* ou do gênero *Glomus* (Tabelas 12, 13, 14) foi maior que o número de esporos de *S. heterogama* ou do gênero *Scutellospora*, o mesmo decresceu aos 70 DAE, embora isto não tenha sido detectado integralmente. Diferentemente, o número de esporos de *S. heterogama* aumentou aos 70 DAE em relação ao número de esporos da espécie no solo antes do plantio (Tabelas 15 a 16). Por outro lado, o gênero *Scutellospora* e mais especificamente a espécie *S. heterogama* mostraram diferenças em relação ao número de esporos dos genótipos Nitrodente e XL 560 aos 140 DAE (Tabelas 15 e 16). As tendências simultaneamente opostas, em relação a flutuação de *G. etunicatum* quando comparada a flutuação de *S. heterogama* podem ser observadas de forma mais clara tendo-se como referência o genótipo XL 560 aos 70 DAE (Tabelas 13 e 16).

TABELA 15. Número de esporos do gênero *Scutellospora* durante o ciclo vegetativo de 4 genótipos de milho.

Genótipos	Nº de esporos/50 cm <sup>3</sup>			
	Inicial	70 DAE	105 DAE	140 DAE
C. Sobrália	11 a	23 a	25 a	13 ab
Cravinho	5 a	28 a	30 a	9 ab
Nitrodente	7 a	31 a	41 a	23 a
XL 560	3 a	10 a	18 a	5 b
CV (%)	57,5	46,2	56,3	40,8

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste Tukey. Médias de 3 repetições.

TABELA 16. Número de esporos da espécie *Scutellospora heterogama* durante o ciclo vegetativo de 4 genótipos de milho.

Genótipos	Nº de esporos/50 cm <sup>3</sup>			
	Inicial	70 DAE	105 DAE	140 DAE
C. Sobrália	7 a	17 a	23 a	10 ab
Cravinho	2 a	22 a	21 a	7a b
Nitrodente	7 a	29 a	36 a	21 a
XL 560	1 a	6 a	12 a	4 b
CV%	69,2	25,5	21,6	20,4

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste Tukey. Médias de 3 repetições.

As observações de que esporos do gênero *Glomus* estiveram sempre em maior número que *Scutellospora* em todos os genótipos ( Tabelas 12 e 15 ) corrobora o de Schenck e Kinlock (1980), que trabalhando com inóculo misto observaram uma maior produção de esporos do gênero *Glomus* em todos os genótipos e em todas as coletas. Da mesma forma que em nosso ensaio, a população inicial deste já era maior que das demais espécies. Em relação ao maior número de esporos do gênero *Glomus* em relação ao gênero *Scutellospora* ao final do experimento, Johnson et al (1992) já demonstraram que o cultivo de milho levava a maior densidade de esporos de duas espécies de *Glomus* sp em um sítio amostrado. Em outro sítio, outra espécie de *Glomus* sp teve a maior densidade relativa e como no nosso ensaio, estas espécies já estavam em abundância no solo antes do plantio. Ao contrário, *Scutellospora* e *S. heterogama* tiveram seus números de esporos aumentados em relação à coleta inicial em todos os genótipos, a exceção de XL 560. Isto sugere que até 70 DAE houve pelo menos um ciclo do fungo, considerando como tal a colonização das raízes, o crescimento micelial e a esporulação. Por outro lado, pode ser simplesmente uma germinação tardia ou mesmo um erro metodológico. Neste caso, como já dissemos, achamos ter imposto um controle experimental razoável, haja visto os números de esporos de espécies pouco detectadas, que foram recuperadas desde o período inicial em baixa densidade (Tabela 9). Diferentemente do estabelecido por An; Guo e Hendrix (1993), *Scutellospora weresubiae* não foi detectada esporadicamente em nosso ensaio e sim em baixa densidade (Tabela 9).

TABELA 17. Densidade relativa do gênero *Glomus* durante o ciclo vegetativo de 4 genótipos de milho. Médias de 3 repetições.

Genótipos	% de ocorrência			
	Inicial	70 DAE	105 DAE	140 DAE
C. Sobrália	56 a	52 a	60 a	81 a
Cravinho	67 a	29 a	72 a	84 a
Nitrodente	65 a	38 a	53 a	68 a
XL 560	63 a	69 a	73 a	73 a
CV%	10,5	40,9	17,2	12,8

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste Tukey. Médias de 3 repetições.

Devido a significativa diminuição do número de esporos das espécies *G. etunicatum* e *G. macrocarpum* e ao pequeno aumento observado no gênero *Scutellospora*, os dados referentes a densidade relativa destes gêneros e espécies de maior ocorrência foram semelhantes, a exceção do genótipo XL 560, que manteve o controle da densidade relativa de forma diferenciada dos outros três genótipos (Tabelas 18).

TABELA 18. Densidade relativa da espécie *Glomus etunicatum* durante o ciclo vegetativo de 4 genótipos de milho.

Genótipos	% de ocorrência			
	Inicial	70 DAE	105 DAE	140 DAE
C. Sobrália	39 a	0 b	25 a	34 a
Cravinho	37 a	0 b	24 a	31 a
Nitrodente	28 a	0 b	21 a	23 a
XL 560	28 a	41 a	33 a	27 a
CV (%)	25,9	80,4	22,1	23,8

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste Tukey. Médias de três repetições.

Em relação aos gêneros *Glomus* e *Scutellospora*, podemos observar que a densidade relativa do gênero *Glomus* não variou durante todo o período amostrado, incluindo a população inicial do solo (Tabela 17), ao contrário *Scutellospora* sofreu um ajuste aos 70 e 105 DAE em relação a população inicial. Nota-se mais uma vez, a indiferença do genótipo XL 560, não reagindo da mesma forma que os outros genótipos (Tabelas 20 e 21).

Diferenças marcantes não foram detectadas nas espécies de FMA e nos genótipos através dos dados mais contrastantes (Tabelas 20 e 21). Foram entretanto detectadas em dados com menor variação inicial em sua população, como por exemplo a flutuação sazonal da espécie *G. macrocarpum* (Tabela 19). Embora a densidade relativa desta espécie mostre apenas uma tendência de aumento ao final do ciclo amostrado, mostra também uma diferença significativa entre os genótipos aos 105 DAE.

TABELA 19. Densidade relativa da espécie *Glomus macrocarpum* durante o ciclo vegetativo de 4 genótipos de milho.

Genótipos	% de ocorrência			
	Inicial	70 DAE	105 DAE	140 DAE
C. Sobrália	12 a	4 a	35 ab	56 a
Cravinho	25 a	12 a	46 a	49 a
Nitrodente	33 a	14 a	31 b	37 a
XL 560	33 a	22 a	40 ab	38 a
CV%	29,6	90,5	8,5	16,2

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste Tukey. Médias de 3 repetições.

Como observado nas Tabelas 20 e 21 a densidade relativa de *Scutellospora* e *S. heterogama* ao final do ciclo tendem a voltar ao patamar inicial, embora não tenha sido detectada diferença significativa nestes parâmetros.

TABELA 20. Densidade relativa do gênero *Scutellospora* durante o ciclo vegetativo de 4 genótipos de milho.

Genótipos	% de ocorrência			
	Inicial	70 DAE	105 DAE	140 DAE
C. Sobrália	10 a	48 a	28 a	12 a
Cravinho	4 a	57 a	23 a	9 a
Nitrodente	9 a	52 a	39 a	22 a
XL 560	5 a	21 a	22 a	16 a
CV%	95,5	44,0	41,3	33,1

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste Tukey. Médias de 3 repetições.

TABELA 21. Densidade relativa da espécie *Scutellospora heterogama* durante o ciclo vegetativo de 4 genótipos de milho.

Genótipos	% de ocorrência			
	Inicial	70 DAE	105 DAE	140 DAE
C. Sobrália	5 a	35 a	26 a	8 a
Cravinho	2 a	44 a	18 a	7 a
Nitrodente	9 a	48 a	34 a	20 a
XL 560	3 a	12 a	14 a	13 a
CV%	87,7	41,1	24,6	26,0

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste Tukey. Médias de 3 repetições.

O cultivo e o manejo do solo influem sobremaneira na população qualitativa dos FMA. Em relação à maior diversidade em solos naturais ou em sistemas de rotação de cultura, é esperada uma redução no número de espécies presentes, quando do monocultivo, conforme demonstrado na comparação feita entre os trabalhos de Schenck ; Siqueira e Oliveira (1989) e de Siqueira ; Colozzi-Filho e Oliveira (1989). Trabalhando no cerrado brasileiro em solo não perturbado, Schenck; Siqueira e Oliveira (1989) encontraram uma população composta por 18

espécies, enquanto Siqueira; Colozzi-Filho e Oliveira (1989), trabalhando no mesmo sítio em monocultivo de milho encontraram uma população formada por 12 espécies. O mesmo parece ter ocorrido em nosso trabalho. Na Tabela 10, podemos observar o índice de ocorrência das espécies de FMA presentes no solo antes do nosso ensaio (oriundo de um plantio anterior de um consórcio milho-feijão, feijão de porco no ano seguinte e um pousio de seis anos) e durante o monocultivo de milho. Considerando a presença de espécies de FMA antes do plantio em relação à avaliação efetuada aos 140 DAE, podemos observar uma redução no número de espécies presentes, variando em média de oito espécies detectadas inicialmente para cinco espécies ao final do ensaio. Destaque-se a menor diversidade de espécies de FMA encontradas ao final do ensaio em relação ao solo antes do plantio, mostrando um efeito do monocultivo do milho no ajuste da população de fungos micorrízicos. Siqueira e Saggin (1995), revisando a diversidade de espécies de FMA na cultura do milho relataram a ocorrência de até 12 espécies associadas à cultura no sudeste do Brasil, com a percentagem de espécies recuperadas variando de 0 à 31 %. Cita ainda que o número de espécies em um ecossistema pode variar de 2 à 33, de acordo com o manejo utilizado, decrescendo de agrossistemas pouco trabalhados à áreas muito perturbadas. Considerando o controle experimental imposto e a diferença detectada aos 40 DAE na taxa de colonização de raízes, com o posterior ajustamento aos 70 DAE, acreditamos que o trabalho efetuado auxilie na interpretação da evolução e sincronismo destas associações. Pelo observado em nosso trabalho, também entre genótipos de uma mesma espécie, os eventos não puderam ser detectados de forma simultânea ou sincronizada. O ajuste ocorrido entre 70 e 105 DAE nos parâmetros de colonização de raízes e número e espécies de esporos predominantes de FMA é emblemático na demonstração da influência da planta de uma maneira geral, e de genótipos diversos em especial, nas respostas encontradas nos parâmetros avaliados ou seja, na flutuação sazonal das espécies e na taxa de colonização de raízes.

### 4. 3. Produção de matéria seca e grãos, concentração e acúmulo de nutrientes

Na Tabela 22 observa-se que aos 70 DAE os conteúdos de N, P e K acompanham o acúmulo de matéria seca de cada genótipo. De uma maneira geral podemos dizer que genótipos melhorados foram mais produtivos nestas condições, com destaque para Nitrodente. A tendência de maior % N em Cravinho refletiu em uma diferença de conteúdo de N total de 20 % em relação a XL 560 e de 45 % em relação a Nitrodente. Em termos de produção de massa seca esta diferença foi de 35 e 45 %, respectivamente. O genótipo Caiano de Sobrália apresentava os menores valores em relação a produção de matéria seca, concentração de N e P e conteúdo total de N, P e K (Tabela 22).

TABELA 22. Produção de matéria seca, concentração e acúmulo de nutrientes em 4 genótipos de milho aos 70 DAE. Médias de 3 repetições.

Genótipos	Matéria seca (g.planta <sup>-1</sup> )	Concentração (g.kg <sup>-1</sup> )			Conteúdo (mg.planta <sup>-1</sup> )		
		N	P	K	N	P	K
C. Sobrália	33 b	6,8 a	1,5 a	12,0 a	224 b	48 b	396 b
Cravinho	45 b	8,3 a	1,6 a	13,7 a	392 ab	68 ab	620 ab
Nitrodente	81 a	7,3 a	1,4 a	10,2 a	590 a	108 a	840 a
XL 560	69 a	7,1a	1,5 a	10,1 a	486 ab	102 a	768 ab
CV (%)	19,8	11,2	19,5	15,2	21,3	23,6	30,1

Médias na mesma coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste Tukey.

Já na colheita realizada aos 70 DAE, o genótipo Nitrodente expressava seu potencial de boa produtividade nas condições deste ensaio, se considerarmos sua formação de espigas ou sua produção de matéria seca (Tabela 22). Enquanto este genótipo manteve este desempenho, expresso pela sua produção de grãos e pelo aumento significativo no número de espigas por planta aos 140 DAE, XL 560 não pode expressar seu potencial produtivo, devido provavelmente, ao fato de estar fora de suas condições de obtenção e uso, ou seja, em baixo nível tecnológico.

A produção de grãos, avaliada ao final do experimento aos 140 DAE, mostra que o genótipo Nitrodente foi o melhor em relação aos demais genótipos (Tabela 23). O genótipo Caiano de Sobrália que apresentou menor peso de matéria seca aos 70 DAE (Tabela 22), foi superior aos genótipos Cravinho e XL 560 na produção de grãos (Tabela 23). Isto refletiu

sobremaneira no conteúdo de nutrientes. Já o híbrido XL 560 apresentou valores menores de concentração e conteúdo de nutrientes em relação aos genótipos não melhorados.

TABELA 23. Produção de grãos, concentração e acúmulo de nutrientes nos grãos em 4 genótipos de milho aos 140 DAE. Médias de 3 repetições.

Genótipos	Grãos (g. planta <sup>-1</sup> )	Concentração (g.kg <sup>-1</sup> )			Conteúdo (mg.planta <sup>-1</sup> )		
		N	P	K	N	P	K
C. Sobrália	13,7 b	10,7 a	5,3 a	1,4 a	144 b	72 b	20 b
Cravinho	4,8 c	10,7 a	4,5 a	1,4 a	50 c	20 c	6 c
Nitrodente	27,9 a	10,7 a	5,0 a	1,4 a	302 a	140 a	40 a
XL 560	7,9 c	9,6 a	4,2 a	1,3 a	72 bc	32 bc	10 bc
CV (%)	18,7	7,4	13,9	9,5	27,7	30,2	25,9

Médias na mesma coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste Tukey.

O genótipo Cravinho, embora tenha aumentado em 500 % seu número de espigas/planta, da coleta aos 70 DAE para a coleta efetuada aos 140 DAE, não teve este aumento detectado, ao contrário de Caiano de Sobrália que teve um aumento de 150 % no mesmo parâmetro detectado. Ao contrário de todos os genótipos, que de uma maneira geral aumentaram esses valores (Tabela 24), o genótipo XL 560 teve seu número de espigas/planta diminuído sensivelmente, da coleta efetuada aos 70 DAE para a coleta efetuada aos 140 DAE (18 %).

TABELA 24. Número de espigas/planta e produção de grãos/espiga (g) em 4 genótipos de milho aos 70 e 140 DAE. Médias de 3 repetições.

Genótipos	Número de espigas/planta		Grãos/espiga 140 DAE (g)
	70 DAE	140 DAE	
C. Sobrália	0,203 b B	0,493 ab A	25,1 b
Cravinho	0,053 b A	0,263 b A	14,6 b
Nitrodente	0,567 a A	0,673 a A	46,2 a
XL 560	0,727 a A	0,600 ab B	21,9 b
CV (%)	32,3	23,0	16,3

Médias na mesma coluna seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste Tukey.

Médias na mesma linha seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste F.

Os genótipos Nitrodente e XL 560 apresentaram um maior número de espigas/planta do que Caiano de Sobrália e Cravinho tanto quando avaliados aos 70 DAE quanto aos 140 DAE (Tabela 24). Entretanto, os genótipos Caiano de Sobrália e Cravinho aumentaram consi-

deravelmente o número de espigas/planta da avaliação feita aos 70 DAE para a realizada aos 140 DAE. O mais interessante é que o genótipo Caiano de Sobrália produziu praticamente a mesma quantidade de grãos/espiga que o híbrido XL 560, enquanto Nitrodente praticamente dobrou em relação ao híbrido e Cravinho (Tabela 24). O genótipo Cravinho, embora não tenha diferido estatisticamente de Caiano de Sobrália, foi aquele que apresentou expressivo menor valor de grãos/espiga ou grão total.

Embora seja um assunto de grande interesse científico, não temos subsídios para maiores discussões sobre a influência recíproca dos microrganismos aqui estudados. As correlações efetuadas entre os resultados apresentados não mostraram-se claros, dado principalmente a ocorrência generalizada de correlações, ora negativas, ora positivas. Acreditamos que os fatores que podem ter levado a esta situação, sejam exatamente os mesmos que não permitem maiores inferências sobre as correlações, sabidamente não encontradas, entre os eventos da micorrização (Gemma e Koske, 1988; Howeler e Sieverding, 1983; Franson e Bethlenfalvay, 1989, Vierheilig e Ocampo, 1991) As correlações das análises de regressão envolvendo a planta e os microrganismos tiveram o mesmo comportamento ambíguo, não permitindo também maior detalhamento.

A respeito das análises de regressão realizadas, queremos ressaltar a correlação mostrada na Figura 2, com os resultados de todos os genótipos do segundo ensaio, conduzido no campo experimental do CNPAB. Observa-se que o número de esporos presentes no solo antes do plantio influenciou a ocorrência de bactérias diazotróficas no colmo aos 40 DAE ( $r: 0,698^*$ ). Pode-se observar nesta figura que o genótipo Caiano de Sobrália apresentava tendência a ter os maiores valores de bactérias diazotróficas no colmo aos 40 DAE influenciado pelo maior número de esporos antes do plantio.

Em relação à presença de bactérias no interior da planta influenciada pelos FMA e pelos genótipos, observou-se diferenças acentuadas entre os genótipos quando estudados separadamente: o genótipo XL 560 foi o que demonstrou o maior coeficiente de correlação ( $r: 0,994$ ), seguido de Caiano de Sobrália ( $r: 0,958$ ). O genótipo XL 560 obteve também, a menor ocorrência de bactérias no colmo nesta data. Estes coeficientes, entretanto, não foram significativos ao nível de 5 % de probabilidade, devido ao pequeno número de repetições (três), já que os mesmos foram analisados isoladamente (dados não mostrados).

A correlação encontrada entre número de esporos antes do plantio e de bactérias presentes no colmo aos 40 DAE ( $r: 0,698^*$ ) foi obtida devido aos coeficientes encontrados para Caiano de Sobrália ( $r: 0,958$ ) e XL 560 ( $r: 0,994$ ), que apresentavam-se nos extremos da escala



Diferenças acentuadas foram observadas entre os genótipos, quando estudados separadamente também em relação a produção de massa seca, concentração e conteúdo de nutrientes na avaliação feita aos 70 DAE. Porém, o índice de correlação entre estes parâmetros e o número de esporos antes do plantio é baixo quando os genótipos são analisados em conjunto. A produção de matéria seca aos 70 DAE dos genótipos Cravinho e Nitrodente mostraram altos coeficientes de correlação em relação ao número de esporos de FMA presentes no solo antes do plantio ( $r$ : 0.998\* e 0.997\*, respectivamente). Alta correlação entre número de esporos de FMA no solo antes do plantio e percentagem de N e K ( $r$ : 0.996\* e 1.0\*\*, respectivamente) foi verificada no genótipo XL 560 quando analisado separadamente. Ainda em XL 560 foi verificada alta correlação para conteúdo de P em relação ao número de esporos antes do plantio ( $r$ : 0.996\*).

Embora vários autores mostrem um efeito sinérgico envolvendo os microrganismos aqui estudados em benefício do hospedeiro (Paula et al, 1991; 1992; 1994; Reis, Paula e Pereira, 1995), não foi possível concluirmos na mesma direção, nem poderíamos, haja visto não termos uma testemunha não inoculada. Garbaye (1994) faz uma extensa revisão sobre a presença de diversas bactérias em ecto e endomicorrizas e conclui que além de muito comum, a presença das bactérias auxilia os fungos micorrízicos em vários aspectos, e enfatiza a associação íntima com organismos simbióticos. Os efeitos desta associação citados pelo autor são: na receptividade dos fungos, no reconhecimento fungo-raiz, em modificações do solo da rizosfera e na germinação do fungo. Sugere que o efeito mais importante talvez seja a não necessidade de fumigação ou outro tratamento para aumentar a eficiência de utilização, considerando no caso, que as bactérias aumentam a infectividade e competitividade dos fungos. Porém, como visto neste trabalho, as associações precisam ser monitoradas com rigor, para o possível uso de associações que beneficiem o hospedeiro.

Nas condições experimentais aqui relatadas, conclui-se que genótipos selecionados para melhor utilização de nutrientes ou para bom crescimento e produtividade com aplicação de baixos níveis tecnológicos, devem ser trabalhados e utilizados em mais ensaios que visem o melhor aproveitamento de fontes naturais de fertilizantes e/ou o uso de microrganismos economizadores de nutrientes.

## 5. CONCLUSÕES

- Há uma correlação entre o número de esporos antes do plantio e o número de bactérias diazotróficas no colmo aos 40 DAE nos genótipos avaliados no ensaio conduzido no CNPAB.
- Aos 40 DAE os genótipos apresentavam diferenças nos níveis de colonização de raízes por FMA, quando Caiano se diferiu dos genótipos Cravinho e Nitrodente.
- O genótipo Nitrodente apresentou melhor produção de matéria seca aos 70 DAE e de grãos aos 140 DAE, nas condições estudadas.
- O genótipo XL 560 teve sua percentagem de colonização de raízes aumentada continuamente até o final do experimento, quando comparado aos demais genótipos à cada coleta.
- Ocorreu maior número de bactérias diazotróficas no interior da planta em genótipos melhorados geneticamente, aos 120 DAE, no ensaio realizado em cooperação com a Rede PTA e instalado no Rio de Janeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. Factores influencing the occurrence of vesicular arbuscular mycorrhizas. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.35, p.121-150, 1991.
- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. Infectivity and effectiveness of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: effect of inoculum type. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.32, p.631-639, 1981
- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. The role of vesicular-arbuscular micorrhizal fungi in agriculture and the selection of fungi for inoculation. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.33, n.2, p.389-408, 1982.
- ALTIERI, M.A. **Agroecologia: As Bases Científicas da Agricultura Alternativa**. Rio de Janeiro: PTA/FASE, 1989, 240p.
- AMIJEE, F.; STRIBLEY, D.P.; TINKER, P.B. The development of endomycorrhizal root systems. VIII. Effects of soil phosphorus and fungal colonization on the concentration of noluble carbohydrates in roots. **New Phytologist**, Oxford, v.123, p.297-306, 1993.
- AN, Z.Q.; GUO, B.Z.; HENDRIX, J.W. Populations of spore and propagules of mycorrhizal fungi in relation to the life cycles of tall fusce and tobacco. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.25, p.813-817, 1993.
- BALDANI, J.I. **Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com as outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz**. Itaguai: UFRRJ, 1984. 110p. (Tese de Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas).
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.36, p.86-93, 1986.
- BALDANI, J.I.; BLANA, R.A.G.; DÖBEREINER, J. Efeito do genotipo do milho na atividade da nitrogenase e do nitrato redutase. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.14, n.2, p.165-173, 1979.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.29, p.924-929, 1983.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.4, n.1, p.37-40, 1987.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, Israel, v.13, p.65-73, 1992.
- BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.11, p.433-439, 1982.

- BALOTA, E.L. **Interação de bactérias diazotróficas e fungos micorrizicos arbusculares na cultura da mandioca (*Manihot sculenta* GRANTZ).** Itaguaí, UFRRJ, , 1994, 280p. (Tese de Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas).
- BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Horizontal and vertical movement of *Azospirillum brasilense* Cd in the soil and along the rhizosphere of wheat and weeds in controlled and field environments. **Journal of General Microbiology**, London, v.133, p.3473-3480, 1987.
- BEIJERINCK, M.W. Uber ein *Spirillum*, welches freien stickstoff binden kann? **Zentralblatt fuer Bakteriologie**, Stuttgart, v.63, n.18, p.353-359, 1925.
- BERTHEAU, Y.; GIANINAZZI PEARSON, V; GIANINAZZI, S. Development et expression de l'association endomycorhizienne des le ble. I. Mise en evidence d'un effet varietal. **Amelior. Plantes**, v.30, p.67-78, 1980.
- BETHLENFALVAY, G.J.; BAYNE, H.G.; PACOVSKY, R.S. Parasitic and mutualistic associations between a mycorrhizal fungus and soybean: The effect of phosphorus on host plant-endophyte interactions. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.57, n.4, p.543-548, 1983.
- BODDEY, R.M.; CHALK, P.M.; VICTORIA, R.L.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J. The use of the  $^{15}\text{N}$  isotope dilution technique applied to the estimation of biological nitrogen fixation associated with *Paspalum notatum* cv. Batatais in the field. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.15, p.25-32, 1983 a.
- BODDEY, R.M.; CHALK, P.M.; VICTORIA, R.L.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J. The use of the  $^{15}\text{N}$  isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum* cv. batatais. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.29, p.1036-1045, 1983 b
- BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent results and perspectives for future research. **Plant and Soil**, The Hague, v.108, p.53-65, 1988.
- BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; REIS, V.M. Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar. **Alcool & Açúcar**, São Paulo, n.53, p.12-19, 1990.
- BODDEY, R.M.; VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using  $^{15}\text{N}$  labelled organic matter and fertilizer. **Plant and Soil**, The Hague, v.90, p.265-292, 1986.
- BOLAN, N.S. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. **Plant and Soil**, The Hague, v.134, n.2, p.189-207, 1991.
- BULOW, J.F.W.von; DÖBEREINER, J. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.72, n.6, p.2389-2393, 1975.
- BUWALDA, J.G.; GOH, K.M. Host-fungus competition for carbon as a cause of growth depressions in vesicular-arbuscular mycorrhizal ryegrass. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.14, n.2, p.103-106, 1982.
- BUWALDA, J.G.; ROSS, G.J.S.; STRIBLEY, D.P.; TINKER, P.B. The development of endomycorrhizal root systems. IV. The mathematical analysis of effects of phosphorus on the spread of vesicular arbuscular mycorrhizal infection in root systems. **New Phytologist**, Oxford, v.92, p.391-399, 1982.

- CAVALCANTE, V.A.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, The Hague, v.108, p.23-31, 1988.
- CLARK, R.B. Plant genotypes differences in the uptake, translocation accumulation and use of elements required for plant growth. *Plant and Soil*, The Hague, v.72, p.175-195, 1983.
- DAY, J.M.; DOBEREINER, J. Physiological aspects of N<sub>2</sub>-fixation by a *Spirillum* from *Digitalis* roots. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.8, p.45-50, 1976.
- DHILLON, S.S.; AMPORNAN, L. The influence of inorganic nutrient fertilization on the growth, nutrient composition and vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization of pretransplant rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.13, n.2, p.85-91, 1992.
- DOBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp. n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.1, p.357-365, 1966.
- DOBEREINER, J. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. *International Congress of Nitrogen Fixation*, XII, Cancun, 1992a. *Resumos... Washington, D.C.: NAS*, 1992 a. p.87
- DOBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em gramíneas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.1, n.1, p.1-9, 1977
- DOBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em gramíneas tropicais. *Interciência*, Caracas, v.4, n.4, p.200-205, 1979.
- DOBEREINER, J. Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the rhizosphere of *Paspalum notatum* Flugge. *Zentralblatt fuer Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*, Stuttgart, v.124, n.3, p.224-230, 1970.
- DOBEREINER, J. Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, New York Academic Press, 1995. p.134-141.
- DOBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endofytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v.44, n.5, p.310-313, 1992 b.
- DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D. Endophytic bacteria other than rhizobia. *International Symposium of Microbial Ecology*, 7, Santos, 1995. *Resumo S2-5.4.Resumos...Santos*: São Paulo: USP, 1995. p. ir.
- DOBEREINER, J.; DAY, J.M. Nitrogen fixation in the rhizosphere of tropical grasses. In: STEWART, W.D.P., ed. *Nitrogen Fixation by Free-living Micro-organisms*. Cambridge: University Cambridge Press, 1975. p.39-56.
- DOBEREINER, J.; DAY, J.M.; DART, P.J. Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *Paspalum notatum-Azotobacter paspali* association. *Journal of General Microbiology*, London, v.71, p.103-116, 1972.
- DOBEREINER, J.; MARRIÉL, I.E.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.22, n.10, p.1464-1473, 1976.

DOBEREINER, J.; REIS, V.M.; PAULA, M.A.; OLIVARES, F.L. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and futher plants. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W.E. (eds.) *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p.671-676.

DOBEREINER, J.; SOLOMONE, I. Fixação biológica de nitrogênio na cultura do milho. In: *Simpósio Internacional sobre estresse ambiental: O milho em perspectiva*, 1, 1992. Belo Horizonte: EMBRAPA/CIMMYT, 1995. p.281-294.

DODD, J.C.; JEFFRIES, P. Early development of vesicular-arbuscular mycorrhizas in autumn-sown cereals. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.18, p.149-154, 1986.

ESPINOZA VICTORIA, D.; QUINTERO RAMOS, M.; FERRERA CERRATO, R.; BETHLENFALVAY, G.J. Fitting plants to soil through mycorrhizal fungi: plant nutrition in host-endophyte combinations evaluated by the diagnosis and recommendation integrated system. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.15, n.2, p.96-102, 1993.

FALK, E.C.; JOHNSON, J.L.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J.; KRIEG, N.R. Deoxiribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.36, n.1, p.80-85, 1986.

FERNANDES, A.A.; SIQUEIRA, J.O.; MENEZES, M.A.L.; GUEDES, G.A.A. Efeito diferenciado do fósforo sobre o estabelecimento e efetividade da simbiose endomicorrizica em milho e soja. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.11, p.101-108, 1987.

FERREIRA, M.C.B.; FERNANDES, M.S.; DOBEREINER, J. Role of *Azospirillum* nitrate reductase in nitrate assimilation by wheat plants. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.4, p.47-53, 1987.

FRANSON, R.L.; BETHLENFALVAY, G.J. Infection unit method of vesicular arbuscular mycorrhizal propagule determination. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v.53, p.754-756, 1989.

FREY, B.; SCHUEPP, H. Transfer of symbiotically fixed nitrogen from berben (*Trifolium alexandrinum* L.) to maize via vesicular-arbuscular mycorrhizal hyphae. *New Phytologist*, Oxford, v.122, p.447-454, 1992.

FUENTES-RAMIREZ, L.E.; JIMENEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I.R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant and Soil*, The Hague, v.154, n.2, p.145-150, 1993.

FURLANI, P.R.; FURLANI, A.M.C. Estresse nutricional: técnicas de seleção de plantas em apoio ao melhoramento genético. In: REUNIAO BRASILEIRA DE FISIOLOGIA VEGETAL, 2., Piracicaba 1989. Anais... Piracicaba: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 1989. p.93-94.

GAFNY, R.; OKON, Y.; KAPULNIK, Y.; FISCHER, M. Adsorption of *Azospirillum brasilense* to corn roots. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.18, n.1, p.69-75, 1986.

GALLI, F.; CARVALHO, P.C.T.; TOKESHI, H.; BALMER, F.; VIMATI, H.; CARDOSO, C.O.; SALGADO, C.L.; KRUNGER, T.L.; CARDOSO, E.J.; BERGAMIN, F.A. *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 2.ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1980. v.2, p.107.

- GARBAYE, J. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, Oxford, v.128, n.2, p.197-210, 1994.
- GARCIA DE SALAMONE, I.E. **Influencia de bacterias del genero *Azospirillum* sobre el rendimiento y nutrición nitrogenada del cultivo de maíz (*Zea mays* L.)** : University of Buenos Aires. 1993. 172p. (Tese de Mestrado em Nutrição Mineral de Plantas)
- GAVITO, M.E.; VARELA, L. Response of "criollo" maize to single and mixed species inocula of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, The Hague, v.176, p.101-105, 1995.
- GAVITO, M.E.; VARELA, L. Seasonal dynamics of mycorrhizal associations in maize fields under low input agriculture. *Agriculture Ecosystems and Environment*, Amsterdam, v.45, p.275-282, 1993.
- GEMMA, J.N.; KOSKE, R.E. Seasonal variation in spore abundance and dormant of *Gigaspora gigantea* and in mycorrhizal inoculum potencial of a dune soil. *Mycologia*, New York, v.80, p.211-216, 1988.
- GERDERMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Espores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, Cambridge, v.46, p.235-244, 1963.
- GERDERMANN, J.W.; TRAPPE, J.M. The endogonaceae in the pacific northwest. *Mycologia Memoir*, v.5, p.1-76, 1974.
- GILLIS, M.; DÖBEREINER, J.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B.; KERSTERS, K. Taxonomic relationships between *Pseudomonas rubrisubalbicans*, some misnamed clinical isolates (EF group 1) and *Herbaspirillum seropedicae*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION WITH NON-LEGUMES, 5, Florence. **Programme and Abstracts...** Florence : University of Florence/National Research Council of Italy. 1990. p.103.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, Oxford, v.84, p.489-500, 1980.
- HAYMAN, D.S. The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.61, n.3, p.944-945, 1983.
- HEULIN, T.; RAHMAN, M.; OMAR, A.M.N.; RAFIDISON, Z.; PIERRAT, J.C.; BALANDREAU, J. Experimental and mathematical procedures for comparing N<sub>2</sub>-fixing efficiencies of rhizosphere diazotrophs. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, n.9, p.163-173, 1989.
- HOBBELINK, H. **BIOTECNOLOGIA** : Muito além da revolução verde. Porto Alegre: AGE / Palloti, 1990. 196p.
- HOWELER, R.H.; SIEVERDING, E. Potentials and limitations of mycorrhizal inoculation illustrated by experiments with field-grown cassava. *Plant and Soil*, The Hague, v.75, p.245-261, 1983.
- JAIN, D.K.; PATRIQUIN, D.G. Root hair deformation, bacterial attachment, and plant growth in wheat-*Azospirillum* associations. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.48, n.6, p.1208-1213, 1984.
- JANOS, D.P. Mycorrhizae influence tropical succession. *Biotropica*, Washington, v.12, p.56-64, 1980.

- JOHNSON, N.C.; COPELAND, P.J.; CROOKSTON, R.K.; PFLEGER, F.L. Possible explanation for yield decline with continuous corn and soybean. *Agronomy Journal*, Madison, v.84, p.387-390, 1992.
- KAPULNIK, Y.; FELDMAN, M.; OKON, Y.; HENIS, Y. Contribution of nitrogen fixed by *Azospirillum* to the N nutrition of spring wheat in Israel. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.17, n.4, p.509-515, 1985.
- KAPULNIK, Y.; KIGEL, J.; OKON, Y.; NUR, I.; HENIS, Y. Effect of *Azospirillum* inoculation on some growth parameters and N-content of wheat, *Sorghum* and *Panicum*. *Plant and Soil*, The Hague, v.61, n.1, p.65-70, 1981.
- KAPULNIK, Y.; SARIG, S.; NUR, I.; OKON, Y. The effect of *Azospirillum* inoculation on growth and yield of corn. *Israel Journal of Botany*, Jerusalem, v.31, n.1, p.247-255, 1982.
- KHAMMAS, K.M.; AGERON, E.; GRIMONT, P.A.D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Research in Microbiology*, Paris, v.140, p.679-693, 1989.
- KIRCKHHOF, G.; SPRINGER, N.; SMIDA, N.; BALDANI, V.L.D., ABNUS, B.; HARTMANN, A. Use of molecular methods for identification and *in situ* studies of diazotrophic plant colonizing bacteria. International Symposium of Microbial Ecology, 7, Santos, Resumo P1-2.9, 1995. *Resumos...USP*, 1995. p. ir.
- KOEPLER, J.W.; BEAUCHAMP, C.J. A Review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.38, p.1219-1232, 1992.
- KOSKE, R.E.; GEMMA, J.N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research*, Cambridge, v.92, n.4, p.488-505, 1989.
- KRISHNA, K.R.; SHETTY, K.G.; DART, P.J.; ANDREWS, D.J. Genotype dependent variation in mycorrhizal colonization and response to inoculation of pearl millet. *Plant and Soil*, The Hague, v.86, n.1, p.113-125, 1985.
- LAKSHMI, V.; RAO, A.S.; VIJAYALAKSMI, K.; LAKSHMI KUMARI, M.; TILAK, K.V.B.R.; SUBBA RAO, N.S. Establishment and survival of *Spirillum lipoferum*. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences*, Bangalore, v.86, n.6, p.397-404, 1977.
- LEVANONY, H.; BASHAN, Y.; ROMANO, B.; KLEIN, E. Ultrastructural localization and identification of *Azospirillum brasilense* Cd on and within wheat root by immuno-gold labeling. *Plant and Soil*, The Hague, v.117, n.2, p.207-218, 1989.
- LI, R.; MACRAE, I.C. Specific association of diazotrophic Acetobacters with sugarcane. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.23, p.999-1002, 1991.
- LIMA, E.; BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a  $^{15}\text{N}$  aided nitrogen balance. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.19, n.2, p.165-170, 1987.
- LOPES, E.S.; OLIVEIRA, E.; DIAS, R.; SCHENCK, M.C. Occurrence and distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in coffee (*Coffe arabica* L.) plantations in central São Paulo State, Brazil. *Turrialba*, San José, v.33, n.4, p.417-422, 1983.

- MACHADO, A.T.; MAGALHAES, J.R. Melhoria do milho para uso eficiente de nitrogênio em diferentes condições de estresse. In: **Simpósio Internacional sobre Estresse Ambiental: O milho em perspectiva**, 1, Belo Horizonte, 1992. **Simpósio...** Belo Horizonte: EMBRAPA/CIMMYT, 1995. p.321-344.
- MACHADO, A.T.; MAGALHAES, J.R.; MAGNAVACA, R.; SILVA, M.R. Determinação da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio em diferentes genótipos de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.4, n.1, p.45-47, 1992.
- MAGALHAES, F.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.55, n.4, p.417-430, 1983
- MAGALHÃES, J.R.; MACHADO, A.T., Utilização de parâmetros bioquímicos na seleção de milho para eficiência na assimilação de nitrogênio sob condições de estresse. In: **Simpósio Internacional sobre Estresse Ambiental : O milho em perspectiva**, 1, Belo Horizonte, 1992. **Simpósio....** Belo Horizonte : EMBRAPA/CIMMYT , 1995. p.345-368.
- MAGALHÃES, F.M.M.; PATRIQUIN, D.; DÖBEREINER, J. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Biologia**, São Paulo, v.39, p.587-596, 1979.
- MACAULIFFE, C.; CHAMBLEE, D.S.; URIBE ARANGO, H.; WOODHOUSE, W.W. Influence of inorganic nitrogen on nitrogen fixation by legumes as revealed by N<sup>15</sup>. **Agronomy Journal**, Madison, v.50, p.334-337, 1958.
- MCGONIGLE, T.P. **Vesicular-arbuscular mycorrhizas and plant performance in a semi-natural grassland.**, New York. University of York, 1987. 178p. ( PhD Thesis em Nutrição de Plantas)
- MCGONIGLE, T.P.; FITTER, A.H. Ecological specificity of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations. **Mycological Research**, Cambridge, v.94, n.1, p.120-122, 1990.
- MENGE, J.A.; STEIRLE, D.; BAGYARAJ, D.J.; JOHNSON, J.V.; LEONARD, R.T. Phosphorus concentrations in plants responsible for inhibition of mycorrhizal infection. **New Phytologist**, Oxford, v.80, n.3, p.575-578, 1978.
- MIRANDA, C.H.B.; BODDEY, R.M. Estimation of biological nitrogen fixation associated with 11 ecotypes of *Panicum maximum* grown in nitrogen-15-labeled soil. **Agronomy Journal**, Madison, v.79, p.558-563, 1987.
- MIRANDA, C.H.B.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Selection of ecotypes of *Panicum maximum* for associated biological nitrogen fixation using the <sup>15</sup>N isotope dilution technique. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.22, n.5, p.657-663, 1990.
- MORTON, J.B.; BENNY, G.L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. **Mycotaxon**, Ithaca, v.37, p.471-491, 1990.
- MOSSE, B. Effects of different Endogone strains on the growth of *Paspalum notatum*. **Nature**, London, v.239, p.221-223, 1972.
- MOSSE, B. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.11, p.171-196, 1973.

- MOSSE, B.; STRIBLEY, D.P.; Le TACON, F. Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi. **Advanced Microbiology Ecology**, New York, v.5, 137, 1981.
- NEYRA, C.A.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation in grasses. **Advances in Agronomy**, New York, v.29, p.1-38, 1977.
- OHARA, G.W.; DAVEY, M.R.; LUCAS, J.A. Effect of inoculation of *Zea mays* with *Azospirillum brasilense* strains and temperate conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.27, p.871-877, 1981.
- OKON, Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v.3, n.9, p.223-228, 1985.
- OLIVEIRA, E. **Bactérias diazotróficas na cultura do arroz**. UFRRJ, Itaguaí, RJ, 1992. 95p. (Tese de Mestrado em Solo e Nutrição de Plantas).
- PANDEY, S.; CEBALLOS, H.; KNAPP, E.B; VARGAS, J.D. Variabilidade genética do milho e adaptação a diferentes condições de estresse. In: **Simpósio Internacional sobre Estresse Ambiental O milho em perspectivas**, 1, Belo Horizonte, 1992. **Simpósio...** Belo Horizonte: CNPMS/CIMMYT, 1995. p.295-319
- PATRIQUIN, D.G.; DÖBEREINER, J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.24, n.6, p.734-742, 1978.
- PATRIQUIN, D.G.; DÖBEREINER, J.; JAIN, D.K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.29, n.8, p.900-915, 1983.
- PAULA, M.A.; REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. Interaction of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of roots and tops of sweet potato (*Ipomoea batatas*) sugar cane (*Saccharum* sp.) and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.11, p.111-115, 1991.
- PAULA, M.A.; URQUIAGA, S.; SIQUEIRA, J.O.; DÖBEREINER, J. Synergistic effects of VAM fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (*Ipomoea batatas*). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.14, p.61-66, 1992.
- PAULA, M.A.; SIQUEIRA, J.O.; DÖBEREINER, J. Crescimento miscelial de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares na presença de células vegetais e de bactérias diazotróficas "in vitro". **Revista Brasileira de Biologia**, São Paulo, v.54, p.631-639, 1994.
- PEREIRA, J.A.R.; CAVALCANTE, V.A.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, The Hague, v.110, n.2, p.269-274, 1988.
- PEREIRA, J.A.R.; BALDANI, J.I. Selection of *Azospirillum* spp and *Herbaspirillum seropedicae* strains to inoculate rice and maize plants. **International Symposium - Sustainable Agriculture for the Tropics: The Role of Biological Nitrogen Fixation**, 1, Angra dos Reis, 1995. **Resumos...** Angra dos Reis: EMBRAPA/CNPAB, 1995. p.79
- PEREIRA, P.A.A.; BÜLOW, J.F.W. von; NEYRA, C.A. Atividade da nitrogenase, nitrato redutase e acumulação de nitrogênio em milho braquítico *Zea mays* L. (Cv. Piranão) em dois níveis de adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.2, p.28-33, 1976.

- PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.; PITARD, R.M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F.; DÖBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, The Hague, v.137, n.1, p.61-65, 1991.
- POCHON, J.; TARDIEUX, P. Techniques analyse in microbiologia du sol. In: **Collection "Techniques de base"**. France: Editions de la Tourelle. 1962. 89p.
- PORTER, W.M. The most probable number method for enumerating infective propagules of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soil. **Australian Journal of Soil Research**, Victoria, v.17, n.3, p.515-519, 1979.
- QUINTERO RAMOS, M.; ESPINOZA VICTORIA, D.; FERRERA CERRATO, R.; BETHLENFALVAY, G.J. Fitting plants to soil through mycorrhizal fungi: mycorrhiza effects on plant growth and soil organic matter. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.15, n.2, p.103-106, 1993.
- RAIJ, B.van. Fósforo: dinâmica e disponibilidade no solo. In: Curso de atualização em fertilidade do solo, Ilha Solteira: Editora CERES, 1987. p.161-179
- RAJU, P.S.; CLARK, R.B.; ELLIS, J.R. DUNCAN, R.R.; MARAVILLE, J.W. benefit and cost analysis of phosphorus efficiency of VA mycorrhizal fungi colonizations with sorghum (*Sorghum bicolor*) genotypes grown at various phosphorus levels. **Plant and Soil**, The Hague, v.124, p.199-204, 1990.
- REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* L. Kunth). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.37, n.1, p.43-51, 1987.
- REIS, V.M.; PAULA, M.A.de; PEREIRA, J.A.R. Beneficial interactions between arbuscular-mycorrhizae and nitrogen-fixing bacteria other than rhizobia. International Symposium of Microbial Ecology, 7, Santos. **Resumo S2-5.2**, 1995. Resumos...Santos, USP, 1995. p. ir.
- REYNDERS, L.; VLASSAK, K. Nitrogen fixing spirillum species in belgian soils. **Agricultura**, Louvain, v.24, n.4, p.329-336, 1976.
- SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P.B. **Endomycorrhizas**. London: Academic Press. 1975. 626p.
- SCHENCK, N.C.; KINLOCK, R.A. Incidence of mycorrhizal fungi on six field crops in monoculture on a newly cleared woodland site. **Mycologia**, New York, v.72, n.3, p.445-456, 1980.
- SCHENCK, N.C.; PEREZ, Y. **Manual for the identification of mycorrhizal fungi**. Florida: University of Florida. 1988. 241p.
- SCHENCK, N.C.; SIQUEIRA, J.O.; OLIVEIRA, E. Changes in the incidence of VA mycorrhizal fungi with changes in ecosystems. In: V. VANCURA, E.Kunk. (eds.). **Interrelationships between microorganisms and plants in soil**. New York: Elsevier, p. 124-129, 1989.
- SCHWAB, S.M.; MENJE, J.A.; TINKER, P.B. Regulation of nutrient transfer between host and fungus in vesicular-arbuscular mycorrhizal. **New Phytologist**, Oxford, v.117, p.387-398, 1991.

- SIEVERDING, E. Ecology of VAM fungi in tropical agrosystems. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.29, n.1, p.369-390, 1989.
- SIEVERDING, E. **Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems**. Eschborn: GTZ, 1991. 371p.
- SIEVERDING, E.; GALVEZ A, L. Performance of different cassava clones with various VA mycorrhizal fungi. **Angewandte Botanik**, Berlin, v.62, p.273-282, 1988.
- SIQUEIRA, J.O.; COLOZZI-FILHO, A.; OLIVEIRA, E. Ocorrência de micorrizas vesicular-arbusculares em agro e ecossistemas do Estado de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.24, n.12, p.1499-1506, 1989.
- SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. **Biotecnologia do solo; fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC/ESAE/FAEPE/ABEAS. 1988. 235p.
- SIQUEIRA, J.O. ; SAGGIN jr, O. A importância das associações micorrizicas em solos de baixa fertilidade natural. In: **Simpósio Internacional Sobre Estresse Ambiental: O milho em perspectiva**, 1, Belo Horizonte, 1992. Belo Horizonte: EMBRAPA/CIMMYT, 1995. p.239-280.
- SLOGER, L.; OWENS, L.D. Field inoculation of cereal crops with N<sub>2</sub>-fixing *Spirillum lipoferum*. **Plant Physiology**, Bethesda, v.65, Supplement, 1978.
- SMITH, D.; MUSCATINE, L.; LEWIS, D. Carbohydrate movement from autotrophus to heterotrophus in parasite and mutualistic symbioses. **Biological Review**, Cambridge, v.44, p.17-90, 1969.
- SMITH, S.E.; ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K. The involvement of mycorrhizas in assessment of genetically dependent efficiency of nutrient uptake and use. **Plant and Soil**, The Hague, v.146, n.1, p.169-179, 1992.
- SMITH, S.E.; SMITH, F.A. Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses of their relate to nutrient transport. **New Phytologist**, Oxford, v.114, p.1-38, 1990.
- SULLIVAN, C.V.; BLUN, A. Drought and heat resistance of sorghum and corn. In: **Corn and Sorghum Research Conference**, 25, Chicago, 1970. **Proceedings ....** Chicago: Spring & Verlag, 1970. p.55-66.
- TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.24, n.8, p.967-980, 1978.
- TEWARI, L.; JOHRI, B.N.; TANDON, S.M. Host genotype dependency and growth enhancing ability of VA-mycorrhizal fungi for *Eleusine coracana* (finger millet). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, London, v.9, p.191-195, 1993.
- TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.37, p.1016-1024, 1979.
- TOTH, R.; PAGE, T.; CASTLEBERRY, R. Differences in mycorrhizal colonization of maize selections for high and low ear leaf phosphorus. **Crop Science**, Madison, v.24, p.994-999, 1984.

- TOTH, R.; TOTH, D.; STARKE, D.; SMITH, D.R. Vesicular-arbuscular colonization in *Zea mays* affected by breeding for resistance to fungal pathogens. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.68, p.1039-1044, 1990.
- UMALI GARCIA, M.; HUBBELL, D.H.; GASKINS, M.H.; DAZZO, F.B. Association of *Azospirillum* with grass roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.39, n.1, p.219-226, 1980.
- VIERHEILIG, H.; OCAMPO, J.A. Susceptibility and effectiveness of vesicular-arbuscular mycorrhizae in wheat cultivars under different growing conditions. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.11, n.4, p.290-294, 1991.
- WATANABE, I.; BARRAQUIO, W.L.; GUZMAN, M.R. DE; CABRERA, D.A. Nitrogen-fixing (acetylene reduction) activity and population of aerobic heterotrophic nitrogen-fixing bacteria associated with wetland rice. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.37, n.5, p.813-819, 1979.
- 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.