

FUNGOS MICORRÍZICOS, BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS
ENDOFÍTICAS E FÓSFORO NO CRESCIMENTO E ACÚMULO DE
NUTRIENTES EM MUDAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

FERNANDO REYNEL FUNDORA TELLECHEA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO - 2007

FUNGOS MICORRÍZICOS, BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS
ENDOFÍTICAS E FÓSFORO NO CRESCIMENTO E ACÚMULO DE
NUTRIENTES EM MUDAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

FERNANDO REYNEL FUNDORA TELLECHEA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Marco Antonio Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO– 2007

FUNGOS MICORRÍZICOS, BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS
ENDOFÍTICAS E FÓSFORO NO CRESCIMENTO E ACÚMULO DE
NUTRIENTES EM MUDAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

FERNANDO REYNEL FUNDORA TELLECHEA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Produção Vegetal”

Aprovada em 08 de março de 2007.

Comissão Examinadora:

Prof. Fábio Lopes Olivares (Ph.D., Agronomia) – UENF

Prof^a Marta Simone Mendonça Freitas (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF

Prof^a Luciana Aparecida Rodrigues (D.Sc., Produção Vegetal) – FAETEC

Prof. Marco Antonio Martins (Ph.D., Microbiologia do Solo) – UENF

Orientador

AGRADECIMENTOS

Ao meu cunhado Sergio, por seu apoio em todo momento; desde minha saída de Cuba até o momento. Assim como sua esposa Liliana, sobrinhos e Marciane, pela convivência e auxílio no longo tempo distante dos meus filhos e família.

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), pela oportunidade de estudos, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo.

Ao Prof. Marco Antonio Martins, por seu apoio e confiança e pela oportunidade de ser seu orientado.

Ao Prof. Fábio Lopes Olivares, pela orientação e ajuda no trabalho com bactérias diazotróficas endofíticas.

A Prof^a. Marta Simone Mendonça, pela ajuda na estatística e sugestões realizadas que contribuíram para melhorar a apresentação dos resultados do trabalho.

A Prof^a. Luciana Aparecida Rodrigues, por sua ajuda na condução e elaboração da tese.

A Andréia, Vanilda, Kátia, José Accácio e André, pela ajuda e ensinamentos nos trabalhos de laboratório e orientações.

Aos amigos de laboratório Edenilson, Vitor, Quíssila Cristiane, Jonicélia, José Antônio e Juan Carlos.

A Erineudo e colegas do Laboratório do LBCT/CBB, pela ajuda e apoio no trabalho com bactérias.

Aos professores das disciplinas de Estatísticas, Microbiologia do Solo, Física do Solo, Fisiologia do Desenvolvimento e Relações Hídricas, Relação Solo Planta, Mineralogia e Química de Superfícies dos Solos e Nutrição Mineral de Plantas, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos amigos da UFRRJ – Campus Leonel Miranda, Campos dos Goytacazes-RJ - Josil e Luis Francisco e técnicos, pelo fornecimento da variedade de cana-de-açúcar e auxílio na realização do tratamento térmico dos mini-toletes.

Sem a ajuda e união de todos seria impossível o desenvolvimento do trabalho. Não foram poucas às vezes em que pude contar com o auxílio de várias mãos amigas durante à instalação, colheita e análise dos experimentos.

O meu muito obrigado a todas essas pessoas, meus amigos, alunos de pós-graduação, e funcionários da UENF, que fizeram parte de meu dia-a-dia durante estes anos. Estou certo de que nossa amizade não ficará limitada ao final dessa etapa, por longe que nos encontremos, garanto que sempre ficará em nossa memória.

SUMÁRIO

RESUMO	Vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Origem, evolução e classificação botânica da cana-de-açúcar	4
2.2. Fungos Micorrízicos arbusculares (FMAs)	7
2.3. Adubação fosfatada em cana-de-açúcar	9
2.4. Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar por bactérias diazotróficas endofíticas	11
2.5. Interação entre fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas endofíticas	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Delineamento experimental	17
3.2. Características do substrato e adubação	17
3.3. Preparo dos inóculos dos fungos micorrízicos	18
3.4. Preparo dos inóculos das bactérias diazotróficas	19
3.5. Produção dos toletes	19
3.6. Colheita	20
3.7. Variáveis analisadas	20
3.7.1. Produção de matéria seca	20
3.7.2. Análise nutricional da parte aérea	21
3.7.3. Porcentagem de colonização micorrízica	21
3.7.4. Contagem de bactérias diazotróficas endofíticas através da técnica	

do Número Mais Provável (NMP)	21
3.7.5. Análise estatística	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. Produção de matéria seca da parte aérea	23
4.2. Produção de matéria seca e aspectos anatômicos das raízes	24
4.3. Porcentagem de colonização micorrízica	27
4.4. Contagem de Bactérias diazotróficas endofíticas através da técnica do Número Mais Provável (NMP)	28
4.5. Conteúdo de (N, P, K, Ca e Mg) na parte aérea	29
4.5.1. Conteúdo de N na parte aérea	29
4.5.2. Conteúdo de P na parte aérea	31
4.5.3. Conteúdo de K na parte aérea	32
4.5.4. Conteúdo de Ca na parte aérea	33
4.5.5. Conteúdo de Mg na parte aérea	34
5. RESUMO E CONCLUSÕES	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	38
APÊNDICE	51

RESUMO

FUNDORA, Fernando Reynel Tellechea, M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; março de 2007; Fungos micorrízicos, bactérias diazotróficas endofíticas e fósforo no crescimento e acúmulo de nutrientes em mudas de cana-de-açúcar; Orientador: Prof. Marco Antonio Martins; Co-orientador: Prof. Fábio Lopes Olivares.

Conduziu-se um experimento em casa de vegetação com o objetivo de avaliar os efeitos das bactérias diazotróficas endofíticas dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e das doses de fósforo no crescimento e acúmulo de nutrientes de mudas de cana-de-açúcar, variedade RB72454. As mudas foram produzidas a partir de mini-toletes contendo apenas uma gema, que foram previamente submetidas à termoterapia (51 °C por uma hora). As mudas foram cultivadas em vasos de 4L, contendo como substrato uma mistura de solo (cambissolo) e areia na proporção de 1:2 (v/v), esterilizado em autoclave por duas vezes a 121° C. O delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados, em arranjo fatorial 3 x 3 x 3, sendo: três doses de fósforo: 0, 50, e 200 mg kg⁻¹, duas espécies de fungos: *Glomus clarum* e *Glomus etunicatum* e sem micorriza; duas espécies de bactérias endofíticas: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (estirpe PAL-5) e *Herbaspirillum seropedicae* (estirpe HRC54), e sem bactéria, com três repetições. As plantas foram coletadas 90 dias após transplântio. A inoculação das mudas com as bactéria *G. diazotrophicus* e *H. seropedicae*, na dose 0 mg kg⁻¹, aumentou a biomassa seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR).

Todavia, a maior produção de matéria seca foi obtida no tratamento sem bactéria na dose 200 mg P Kg⁻¹ de solo. As bactérias endofíticas não proporcionaram aumentos nos conteúdos de N, P e K da parte aérea das plantas, entretanto, os conteúdos de Ca e Mg aumentam quando se inoculou as planta com as mesmas. Os FMAs não aumentaram a produção de MSPA e MSR, bem como os conteúdo de P, K, contudo, a inoculação com FMAs aumentou os conteúdos de N, Ca e Mg da parte aérea das plantas. As espécies de FMAs e adubação fosfatada influenciaram positivamente no estabelecimento endofítico no tecido radicular de cana-de-açúcar para *G. diazotrophicus* PAL5, o que não foi observado para *H. seropedicae* HRC54.

ABSTRACT

FUNDORA, Fernando Tellechea: Agronomy Engineer, MS State university of North Fluminense Dancy Ribeiro; Marc 2007 Mycorrhizal fungi, diazotrophic endophytic bacteria and phosphorus on the growth and nutrient content in sugar cane. Supervisor: Prof. Marco Antonio Martins e Fábio Lopes Olivares

An experiment under green house conditions was carried out to evaluate the effects of diazotrophic endophytic bacteria, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and doses of phosphorus on the growth and nutrients accumulation in sugar cane, variety RB72454. The plants were produced from cane cutting contend only one axillary bud, that were previously submitted to heating treatment (51 °C for 1h). The sugar-cane plants were cultivated in pots of 4L, contend, as substratum a mixture soil and sand in the ratio of 1:2 (v/v), which was previously sterilized two times at 121°C. The experimental design adopted was random blocks in factorial arrangement 3 x 3 x 3: three doses of P (0, 50, and 200 mg kg⁻¹); two species of fungi (*Glomus clarum* and *Glomus etunicatum*) and without micorriza; two species of endophytic bacteria (*Gluconacetobacter diazotrophicus* - PAL-5, and *Herbaspirillum seropedicae* - HRC54), and without bacterium, with three repetitions. The plants were harvested 90 days after planting. The inoculation with *G. diazotrophicus* and *H. seropedicae*, at 0 mg P kg⁻¹, increased the dry biomass of the shoots (DBS) and roots (DBR). However, the largest production of dry biomass was observed in the treatment without bacterium at 200 mg P kg⁻¹. The endophytic bacteria did not increase the contents of N, P and K of the aerial part of the plants, however, the contents of Ca and Mg was

increased when the plants were inoculated. The inoculation with AMF did not increase the DBS and DBR production, as well as the content of P, K, however, the inoculation with AMF increased the content of N, Ca and Mg of the shoot plants. The species of AMF and P fertilization influenced positively in establishment of *G. diazotrophicus* PAL-5 in the root tissues of plants, what was not observed for *H. seropedicae* HRC54.

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância para a economia de muitos países. No Brasil é a quinta cultura mais plantada, não só para a produção de açúcar como também de álcool combustível, sendo importante fonte de energia renovável, aspecto relevante quanto à questão de sustentabilidade ambiental. Sua exploração começou na época da colonização e hoje está presente em várias regiões do país, sendo uma das principais atividades agrícolas da Região Norte Fluminense.

Segundo dados do IBGE (2006), o Brasil possuía, em 2004, 5.633.700 ha de cana-de-açúcar, com produtividade média em torno de 74 ton. ha⁻¹, com variações médias entre os Estados Brasileiros de 32,1 a 81,7 ton. ha⁻¹, o que é muito baixo quando se compara ao potencial da cultura, que pode chegar a 200 ton. ha⁻¹ (França et al., 2004). A área plantada de cana-de-açúcar no Brasil nos últimos 10 anos aumentou em aproximadamente 29%, enquanto, a produtividade média aumentou apenas 9,6%.

Cita-se a qualidade das mudas como um fator principal para as baixas produtividades obtidas, pois ela influencia na percentagem de sobrevivência, na velocidade de crescimento e na produção final. Além disso, mudas de melhor qualidade, por terem maior potencial de crescimento, exercem um melhor controle da vegetação invasora, reduzindo os custos dos tratamentos culturais (Suárez et al., 2003).

Dentre os manejos das mudas, o tratamento hidrotérmico é fundamental para um cultivo mais saudável e com redução de incidência, especialmente, da doença causada pela bactéria *Leifsonia xily* subsp. *xily* (Lxx), que causa o

raquitismo das soqueiras (RSD). Essa doença é a que mais afeta a cana-de-açúcar no mundo, causando perdas de até 50% em cultivares suscetíveis em condições favoráveis à interação hospedeiro-patógeno (Ricaud e Ryan, 1989; Davis et al., 2000).

O tratamento hidrotérmico, entretanto, pode promover prejuízos, afetando microrganismos benéficos como bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos e suas interações (Gillaspie e Teakle, 1989). Assim, é necessário a reintrodução desses microrganismos, obtendo uma muda mais sadia e com menor investimento, como a aplicação de menores quantidades de fertilizantes químicos.

As bactérias endofíticas são organismos que se caracterizam pela associação íntima com plantas hospedeiras, despertando grande interesse agrônomo. Na cultura da cana-de-açúcar vários estudos têm demonstrado a presença de diferentes espécies de bactérias no interior das raízes, colmos e folhas (Olivares et al., 1996; Döbereiner et al., 1993; Reis et al., 1993), sendo que algumas dessas bactérias endofíticas são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico e promover o crescimento vegetal, atuando sobre o metabolismo das plantas de uma maneira positiva, induzindo a produção de fitormônios e outros metabólicos (Baldani et al., 1999).

A micorrização, através de seu efeito físico, na extensão do sistema radicular e dos efeitos fisiológicos de utilização de fósforo pela planta, representa um importante mecanismo para a maximização da eficiência de fertilizantes fosfatados (Andreola et al., 1985). Estudos realizados por Salas (2002), e Paula et al. (1992) com culturas de trigo e cana-de-açúcar, respectivamente, demonstraram que a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) com bactérias diazotróficas endofíticas podem aumentar o crescimento e os teores de nutrientes nas plantas, com incrementos em sua matéria seca total, pois o fungo aumenta a colonização pelas bactérias.

É de se esperar que com a crise econômica e poluição ambiental, esse estudo venha contribuir para a utilização mais racional dos adubos químicos e buscar técnicas que aumentem a sua absorção e maior aproveitamento dos mesmos o que é extremamente importante (Reis et al., 1999).

Nesse contexto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar os efeitos da interação de bactérias diazotróficas endofíticas, fungos micorrízicos

arbusculares e doses de fósforo no crescimento e acúmulo de nutrientes em mudas produzidas a partir de mini-toletes de cana-de-açúcar, variedade RB72454, após o tratamento térmico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Origem, evolução e classificação botânica da cana-de-açúcar.

Segundo Junqueira (2006), admite-se que a cana-de-açúcar é originária da Nova Guiné, conhecida como uma planta silvestre e ornamental. Da Nova Guiné, a cana-de-açúcar foi se disseminando em várias linhas do sul do Oceano Pacífico, na Indochina, no Arquipélago da Malásia e em Bengala, sendo certo o seu aparecimento como planta produtora de açúcar na Índia tropical.

No mundo, a cana-de-açúcar é cultivada predominantemente em áreas subtropicais, entre 15° e 30° de latitude, mas pode se estender até 35° de latitude, tanto norte, quanto sul. Ela é produzida comercialmente em mais de 70 países e territórios, sendo os maiores produtores o Brasil, Cuba, Índia, México, China, Filipinas, Austrália, África do Sul, Estados Unidos da América e República Dominicana (Castro e Kluge, 2001).

No Brasil, Martim Afonso de Souza, em 1533, fundou na Capitania de São Vicente, próximo à cidade de Santos - SP, o primeiro engenho (Engenho São Jorge dos Erasmo) para produzir açúcar, com mudas de cana oriundas da Ilha da Madeira. Já em 1584, havia no Brasil cerca de 115 engenhos funcionando, graças ao esforço de 10.000 escravos, que produziam mais de 3000 t. ano⁻¹ (Junqueira, 2006). O Brasil é o maior produtor mundial de açúcar, destacando-se os Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Pernambuco, Alagoas e Paraíba (Anuário Brasileiro, 2005).

A variedade de cana-de-açúcar que predominou no primeiro século foi a variedade Creola, que mais tarde foi substituída pela Caiana, mais produtiva e rica em sacarose. Com o passar do tempo, novas variedades foram sendo

introduzidas como a Roxa, a Salangor, a Lousier e a Kavangire. Essas variedades foram substituídas devido a uma epidemia de mosaico na década de 20, abrindo espaço para entrada das variedades Japonesas (POJ) e mais tarde das variedades importadas de Coimbatore (Co), na Índia (Benites, 2004). A partir dos anos 50, as variedades produzidas pelo Instituto do Alcool e Açúcar (IAA), atual UFRRJ, Campus Leonel Miranda, Campos dos Goytacazes-RJ, passaram a ser amplamente cultivadas nos canaviais Brasileiros (Matsuoka, 2000).

As variedades são classificadas pela origem de sua obtenção, pelo ano do cruzamento e pelo número do indivíduo, como por exemplo: RB72454, (República do Brasil, ano de 1972, plantas novas nº 454). Essa variedade foi obtida pelo PLANALSUCAR, Programa de Melhoramento da Cana-de-Açúcar do extinto Instituto do Açúcar e do Alcool e continuado pelo Centro de Ciências Agrárias, da UFSCar, em Araras (Catalogo RB, 2005).

A variedade RB72454 (Figura 1) é a mais plantada na região Norte Fluminense. Dentro de suas características botânicas pode-se citar: colmos eretos, empalhados, de diâmetro médio e de cor verde clara, com manchas de cera escurecidas; entrenós médios, alinhados em leve ziguezigue; gemas ovaladas, pequenas, com almofada estreita; capitel médio, com folhas dispostas em forma contorcida, de largura e comprimento médios, as novas espigadas, podendo apresentar-se dobradas nas pontas e as inferiores curvadas no terço inferior; uma só aurícula, lanceolada, de tamanho médio; bainha esverdeada, mas com áreas arroxeadas. (Catalogo RB, 2005). Resistente a pragas e doenças, sendo alta a resistência à escaldadura-das-folhas, ferrugem; resistência intermediária ao carvão, mosaico, estrias vermelhas, podridão vermelha e broca.

A cana-de-açúcar pertence à divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, subclasse Commiliniidae, ordem Cyperales, família Poaceae, tribo Andropogonae e sub-tribo Sacharininae (Castro e Kluge, 2001). A classificação botânica das espécies mais aceita é a de Jeswiet, desde 1925 (Matsuoka, 2000; Castro e Kluge, 2001), mostrada a seguir.

Saccharum officinarum L(2n=80: admite-se que essa espécie tenha surgido a partir da *S. spontaneum*, *Miscanthus* e *Erianthus arundinaceus*, passando por a *S. robustum*. É a espécie base dos programas de melhoramento, com características especiais, como colmos suculentos, bom teor de sacarose,

pureza do caldo e teor de fibra. São exigentes em clima e solo e muito sensíveis a doenças, como “mosaico”.



Figura 1. Variedade RB 72454
Fonte: Catalogo RB (2005)

Saccharum spontaneum L. ($2n=40-128$): é uma espécie altamente polimórfica que cresce no trópico e sub trópico.

Saccharum robustum Jesw ($2n=60-205$): Supõe-se que essa espécie originou-se da introgressão de *S. spontaneum* com outros gêneros na região de Nova Guiné. Admite-se que a partir desta espécie é que a *S. officinarum* evoluiu, por meio de seleções humanas a procura de tipos mais macios e ricos em caldo açucarado.

Saccharum sinense Roxb ($2n=111-120$) e *Saccharum barberi* Jesw ($2n=81-124$): Eram espécies cultivadas pelos nativos da China e do Norte da Índia.

Saccharum edule ($2n=60-80$): é considerada atualmente um produto da introgressão da espécie *Saccharum officinarum* ou da *Saccharum robustum* com outro gênero, sendo uma série de poliplóides, que se caracterizam pela produção de inflorescência intumescida com flores abortivas e que são utilizadas na alimentação humana.

2.2. Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs)

A capacidade de as raízes das plantas estabelecerem relações simbióticas mutualistas com certos fungos do solo é um fenômeno generalizado na natureza, essas relações são conhecidas como micorrizas (Silveira, 2002).

O termo micorriza foi inicialmente proposto pelo botânico alemão Albert Bernard Frank, em 1885, originando-se da combinação de duas palavras, sendo a primeira do Grego “mikés”, que significa fungo, e a segunda do Latim “rhiza”, que significa raízes, para descrever as associações mutualistas entre as raízes da maioria das plantas vasculares e fungos do solo (Smith e Read, 1997).

Mais de 6.000 espécies de fungos de solo são capazes de formar micorrizas com 240.000 espécies de plantas (Bonfantes-Fasolo e Perotto, 1992).

O gênero *Glomus* é o mais diverso, apresentando cerca de 55% das espécies descritas. O gênero *Gigaspora* com 4% das espécies descritas.

Com base nas características morfológicas e anatômicas, as micorrizas podem ser divididas em três grandes grupos: as ectomicorrizas, as ectendomicorrizas e as endomicorrizas, sendo essa última mais abundante (Ginzberg et al., 1998).

Os fungos micorrízicos arbusculares são simbioses obrigatórios de mais de 80% das plantas vasculares na maioria dos ecossistemas (Ginzberg et al., 1998). A planta, por meio da fotossíntese, fornece fotoassimilados para o metabolismo do fungo, enquanto o fungo proporciona melhor condição para a absorção de nutrientes do solo, garantindo assim a sobrevivência de ambos os simbioses (Marschner e Dell, 1994).

A penetração do fungo e seu estabelecimento nas raízes do hospedeiro envolvem uma seqüência complexa de eventos, os quais resultam na diferenciação das hifas intercelulares terminais em arbúsculos (Bonfantes-Fasolo e Perotto, 1992). Os arbúsculos são envolvidos por uma membrana plasmática vegetal diferenciada e tem papel fundamental na transferência bi-direcional de nutrientes entre os simbioses (Bonfantes-Fasolo e Perotto, 1991).

A classificação taxonômica dos FMAs é mostrado na figura 2

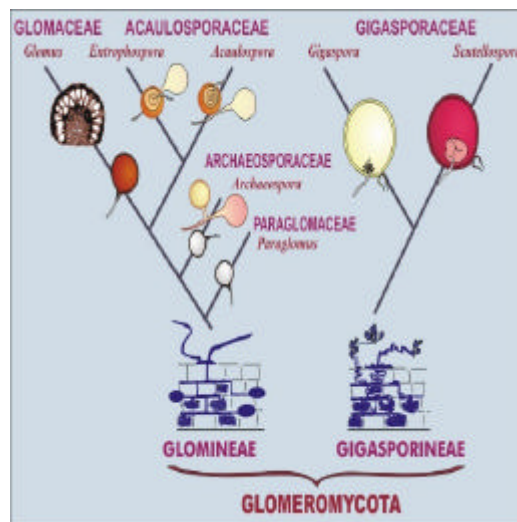


Figura 2. Classificação taxonômica dos fungos micorrízicos arbusculares (INVAM, 2006).

O período de vida de um arbúsculo é de 5 a 10 dias, sendo que após esse período ele colapsa e se descompõe, deixando a célula funcional capaz de ser infestada novamente (Alexander et al., 1988). Algumas espécies de fungo também formam estruturas chamadas vesículas, as quais têm como função o armazenamento de lipídeos (Smith e Gianinazzi-Pearson, 1988).

De modo geral, o estabelecimento desta simbiose resulta em diversos benefícios para a planta hospedeira como: a redução da suscetibilidade a certos patógenos (Dehne, 1982), tolerância ao estresse hídrico (Al-Karaki e Al-Raddad, 1997), alteração da capacidade fotossintética da planta (Huat et al., 2002), maior estabilidade dos agregados no solo (Nóbrega et al., 2001), tolerância a excesso metais pesados (Khan et al., 2000), incremento nas concentrações de aminoácidos na parte aérea (Takahashi, 2005).

Entretanto, o principal benefício do fungo para a planta hospedeira está associado a uma maior absorção de nutrientes, através da extensão do sistema radicular via hifas do fungo, que proporcionam aumento da área da superfície de contato com o solo, favorecendo a maior absorção de nutrientes como: fósforo (Freitas et al., 2006; Hardoim, 2006; Takahashi, 2005; Salas, 2002; Schiavo e Martins, 2002; Pralon e Martins, 2001; Bressan et al., 2001; Pfeffer et al., 1999; Smith e Read, 1997), zinco, cobre (Marschner e Dell, 1994) e também nitrogênio e potássio (Gupta et al., 2002).

2.3 . Adubação fosfatada e FMAs em cana-de-açúcar

O P influencia na brotação, desenvolvimento radicular e alongação dos colmos. É fundamental no metabolismo das plantas, desempenhando papel importante na transferência de energia na célula via os processos de respiração e fotossíntese (Marschner, 1995), Sendo componente chave de moléculas como ácidos nucleicos, fosfolipídios, ATP e açúcares (Schachtman et al., 1998; Grant et al., 2001). A energia contida no ATP é utilizada nos processos de síntese de vários compostos orgânicos como amido, gorduras e proteínas. A presença de fosfato é necessária para a síntese de compostos fosforilados e a falta deste nutriente causa distúrbios imediatos no metabolismo e no desenvolvimento das plantas (César et al., 1993).

A maior parte de P no solo chega até as raízes da planta por difusão, um processo lento e de pouca amplitude, dependendo da umidade, que geralmente é considerada um dos fatores mais limitantes na absorção de P pelas plantas (Grant et al., 2001).

O efeito do P sobre a cana-de-açúcar depende em primeira instância do conteúdo e forma assimiláveis no solo. Outro fator importante é a reação do solo, sendo de maior efeito quando o pH em água é menor que 5,0. As doses recomendadas de P_2O_5 varia entre 0 e 15 kg ha⁻¹ em solos de alto e muito alto conteúdo de P assimiláveis e entre 25 e 60 kg ha⁻¹ em solo de baixo e médio (Cuéllar et al., 2002).

A extração de fósforo pela cana-de-açúcar em termos de quantidades necessárias para produzir 100 t ha⁻¹ de colmo é equivalente a 19 kg ha⁻¹ (Orlando Filho, 1983). Também verifica-se que a deficiência de P nos dois primeiros meses de idade diminuiu a atividade fotossintética da cana-de-açúcar mais do que a deficiência de N ou K.

Teoricamente, o fósforo tem um papel importante na formação de sacarose quando o composto glucose-1-fosfato junta-se com frutose para formar a sacarose (Alexander 1973). Porém, os estudos de Orlando Filho e Zambelo Júnior (1980), Silva (1983), Korndorfer (1990), Pereira et al. (1995) não demonstraram resposta positiva à adubação fosfatada com relação ao acúmulo de sacarose, ou seja, não ocorreram aumentos na produção de açúcar por área.

Os FMAs são reconhecidos pelo benefício considerável que promovem às plantas hospedeiras. Especialmente onde a disponibilidade de nutriente é

baixa, podem ocasionar aumento no crescimento das plantas, particularmente em solos de baixa fertilidade, substituindo em parte os fertilizantes fosfatados e aumentando a eficiência das adubações (Goh et al., 1997).

Poucos estudos sobre micorrização em cana-de-açúcar tem sido realizados, principalmente em virtude da sua baixa dependência micotrófica (Siqueira e Franco, 1988). Sendo uma gramínea de ciclo logo, os efeitos da inoculação com fungos micorrizos arbusculares (FMAs) muitas vezes não podem ser avaliados em experimentos de curta duração em casa de vegetação, onde os fatores climáticos são controlados. Entretanto Andreola et al. (1985) em estudo avaliando o efeito de seis espécies de FMAs sobre o desenvolvimento de três variedades de cana-de-açúcar, demonstraram que a mesma pode ser beneficiada em seu crescimento pela presença de fungos micorrízicos e sua eficiência varia de acordo com a espécie de fungo e variedade de cana-de-açúcar.

Existem vários relatos sobre como os FMAs aumentam a absorção de vários nutrientes, especialmente os poucos móveis no solo, como P, Zn e Cu. As pesquisas enfatizam a necessidade de se obter variedades mais eficientes na utilização de nutrientes e que sejam responsivas a micorrização, garantindo a maior produção possível (Manske et al., 1995).

O P, principal nutriente favorecido pela micorrização, em solos de baixa fertilidade, apresenta maior resposta do que em solos com altas concentrações de P, pois essas podem inibir a colonização micorrízica em plantas hospedeiras (Saggin e Siqueira, 1996).

A diversidade das espécies e a ocorrência generalizada dos FMAs têm sido relatadas em diversas culturas, observando que a cana-de-açúcar apresenta maior diversidade de espécies, que são influenciadas por fatores ambientais como temperatura, umidade e adubação mineral ou orgânica (Siqueira et al., 1989; Andreola, 1982)

Outro estudo da diversidade de FMAs, realizado por Reis et al. (1999) em canaviais localizados no Estado de Rio de Janeiro e Pernambuco, mostrou que a adoção da queima do palhiço nos canaviais por ocasião da colheita diminuiu o número de esporos no solo e a diversidade dos FMAs. As espécies predominantes nos canaviais amostrados foram: *Acaulospora* sp., *Scutelospora heterogama*, *Glomus etunicatum*, *Glomus occultom* e *Gigaspora margarita*.

Takahachi (2005), avaliando a colonização intra-radicular de *Glomus Clarum* em raízes de cana-de-açúcar em duas doses de P concluiu que, em baixas concentrações de P (20 mg kg^{-1}) a porcentagem de colonização era alta, 2,1 vezes maior, comparada com a dose de P (200 mg kg^{-1}) com oito semanas após transplante. Já com 12 semanas após transplante, a porcentagem de colonização era de 5,5 vezes maior que em doses de $200 \text{ (mg kg}^{-1})$ de P no solo.

Hadamim (2006), avaliando a formação de micorrizas arbusculares e análises de transcritomas em raízes de cana-de-açúcar colonizada por *Glomus clarum* em presença de herbicidas, relatou que a taxa de colonização por *G. clarum* foi dependente das doses de P, sendo que as plantas cultivadas com baixo P (20 mg kg^{-1}) apresentaram colonização intra-radicular duas vezes maiores que as cultivadas com alto P (200 mg kg^{-1}), bem como uma maior biomassa de raiz e parte aérea em plantas cultivadas com alto P.

2.4. Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar por bactérias diazotróficas endofíticas.

O nitrogênio (N) exerce grande influência no crescimento da cana-de-açúcar no aumento do número de colmos, sendo o elemento mais utilizado na cultura (Cuéllar et al., 2002).

O N é o constituinte essencial das proteínas, ácidos nucléicos, clorofila e outros compostos orgânicos (Cuéllar et al., 2002). O papel do nitrogênio quase se confunde com o da própria bioquímica das plantas, sendo que cerca de 80 a 90% do N absorvido pelas plantas devem passar para a forma orgânica, ou seja, reduzidos a NH_4^+ . Esse processo redutor envolve a enzima redutase de nitrato, que contém fósforo, ferro e molibdênio. O NH_4^+ produzido fará parte dos aminoácidos elaborados pela planta em reações catalisadas por várias enzimas e magnésio (Epstein, 2006).

A necessidade de N pela cana-de-açúcar é crucial no período de formação da cultura, que vai do período imediatamente após a germinação até o fechamento do canavial, o que ocorre normalmente entre os 3 a 5 meses (Dillewijn, 1952)

Orlando Filho (1983), considera que a ordem da extração de nutrientes pela cana-de-açúcar necessária para produzir 100t de colmo é de (kg.ha^{-1}): 174 de K, 143 de N, 87 de Ca, 49 de Mg e 19 de P.

De acordo com Raij et al. (1997), a faixa de teores de macronutrientes considerada adequada para a cana-de-açúcar é igual a: 18-25; 1,5-3,0; 10-16; 2,0-8,0; 1,0-3,0; 1,5-30 g kg⁻¹, respectivamente para N, P, K, Ca, Mg, S.

Estudos realizados no Brasil mostram que a cultura de cana-de-açúcar produz 100 t. de colmo ha⁻¹ no primeiro ciclo, acumula de 150 a 200 Kg de N ha⁻¹ (Orlando, 1980; Sampaio et al., 1984), e, no segundo corte, esse valor é de aproximadamente 100 a 180 Kg de N ha⁻¹. Após a colheita uma pequena parte deste N permanece no campo, devido à queima da palha e à baixa quantidade de N que permanece nas cinzas. Com isso, se espera que as reservas de N no solo diminuam com o tempo. No entanto, isso não ocorre, pois os solos cultivados com cana-de-açúcar geralmente conservam sua fertilidade nitrogenada.

Estas observações levaram vários pesquisadores a suspeitarem que pudesse existir uma contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN) sobre esta cultura. No final da década de 50, através de estudos com bactérias fixadoras de nitrogênio em plantações de cana-de-açúcar no Estado do Rio de Janeiro, observou-se à existência destas bactérias no solo próxima às raízes (Döbereiner, 1959). Porém, por falta de técnicas apropriadas não foi determinada na época qual a contribuição de N desta bactéria para a cultura. Na década de 70 começou a ser possível, através de novas técnicas, tais como, a utilização de marcadores (N¹⁵), saber se o nitrogênio é proveniente do solo ou fixado biologicamente do ar e comprovar a existência de bactérias fixadoras de atmosférico.

Em estudos realizados na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)/Centro Nacional de Pesquisas de Agrobiologia (CNPAB), encontrou-se quantidades de fixação biológica de nitrogênio associado à variedade CB 47-89, que havia acumulado mais de 150 Kg de nitrogênio ha⁻¹, resultante dos microrganismos associados às plantas (Lima et al., 1987). Paralelos a este resultado, Cavalcante e Döbereiner (1988) e Gillis et al. (1989) descobriram uma nova bactéria fixadora de nitrogênio N₂ atmosférico, denominada *Acetobacter diazotrophicus*. Essa foi a primeira espécie do gênero *Acetobacter* descoberta, capaz de fixar N₂ atmosférico.

A contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN), associada à cultura de cana-de-açúcar, foi quantificada nos estudos feitos por Urquiaga et al. (1992), através do balanço de N e diluição isotópica de N¹⁵. Esses resultados

mostram que cerca de 70% do nitrogênio acumulado no vegetal era proveniente deste processo biológico de redução química de N_2 da atmosfera em uma forma assimilável pela planta. Isto significa que, mesmo em solos pobres, pode ser suficiente para alcançar produções três vezes maiores que a média atual no Brasil, que é de 54 ton ha^{-1} . Para tal, deve-se fornecer todos os outros nutrientes essenciais, de acordo com a análise do solo, além da aplicação de Mo (que participa da síntese da enzima nitrogenase e está presente nas bactérias diazotróficas) e irrigação.

A FBN é considerada como o principal fator responsável pelo balanço energético positivo na produção de combustível biológico. Estudos mostram que a inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar apresenta aumentos de 20 a 30% de N na planta (Oliveira et al., 2000).

Cavalcante e Döbereiner (1988) foram os primeiros a isolar a partir de cana-de-açúcar uma bactéria capaz de fixar nitrogênio com alta tolerância à acidez. Além de crescer e fixar nitrogênio em uma ampla faixa de pH entre 3,0 e 6,0 esse microrganismo também tolera altas concentrações de açúcar (até 30%) e a presença de altos níveis de nitrato (25 mM) não inibe a expressão da atividade da nitrogenase (Stephan et al., 1991). Inicialmente denominada *Saccharobacter nitrocaptans* (Cavalcante e Döbereiner, 1988), essa bactéria foi reclassificada como *Acetobacter diazotrophicus*, nova espécie dentro do gênero *Acetobacter* com base em estudos fenotípicos, taxonômicos e de hibridação DNA-rRNA e DNA-DNA (Gillis et al., 1989). Anos depois foi validada a renomeação de *Acetobacter diazotrophicus* para um novo gênero *Gluconacetobacter*, com base no tipo predominante de ubiquinona produzida-Q10- e na seqüência de 16S RDNAr (Yamada et al., 1997).

Gluconacetobacter diazotrophicus são bastonetes retos com extremidades arredondadas com dimensões de $0,7 \times 0,9 \times 2,0 \mu\text{m}$, móveis, contendo flagelos laterais ou peritráqueos. As colônias apresentam pigmento marrom em placas de meio de cultivo batata P (contendo alto teor de açúcar) e alaranjada em meio LGIP, contendo azul de bromotimol (Döbereiner et al., 1995). A temperatura ótima de crescimento e fixação de N_2 é de 30°C e o pH inicial para o crescimento é de 5,5 - 6,0. *G. diazotrophicus* não cresce em pH 7,0 e não é capaz de produzir H_2S a partir de L-cisteína (Gillis et al., 1989).

Apesar de outras bactérias diazotróficas terem sido encontradas na cultura de cana-de-açúcar, o alto número (10^6) em que *G. diazotrophicus* tem sido encontrada e o seu caráter endofítico têm feito com que diversos autores considerem este diazotrófico como um dos principais responsáveis pelos altos níveis de FBN observado em canaviais (Dong et al., 1994; Döbereiner et al., 1995). *G. diazotrophicus* tem sido isolado a partir de raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar de diversas regiões do Brasil, Austrália, México, África do Sul e Cuba (Cavalcante e Döbereiner, 1988).

Outra bactéria endofítica de grande importância pertence ao gênero *Herbaspirillum*, fazendo parte das bactérias endofíticas obrigatórias. *Herbaspirillum* spp. são bactérias gram negativas, em formato de bastonetes curvos, fixadoras de nitrogênio em condições de microaerofilia. São conhecidas duas espécies do gênero capazes de fixar N_2 , *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*, muito semelhantes e podem ser identificadas por algumas fontes de carbono (Olivares et al., 1997).

A bactéria *H. seropedicae* teve sua primeira descrição feita por Baldani et al. (1986a), Até então considerada um leve patógeno em algumas variedades de cana-de-açúcar, afeta pouco as variedades comerciais brasileiras (Pimentel et al., 1991).

Representantes do gênero *Herbaspirillum* são microaerofílicas, toleram drásticas mudanças no pH (5,3 - 8,0) e uma concentração de oxigênio maior que as espécies de *Azospirillum* (Baldani et al., 1986), que também são bastante semelhantes entre si, podendo, as mesmas, serem diferenciadas através do uso preferencial de duas fontes de C,N-acetil glucosamida e meso-eritritol. A espécie *H. seropedicae* é capaz de usar N-acetil-glucosamina como única fonte de C. As duas espécies podem ser também separadas através do uso de sondas de oligonucleotídeos (Döbereiner et al., 1995).

H. seropedicae tem sido isolada de muitas gramíneas, tais como: Milho, sorgo, arroz, cana-de-açúcar e várias espécies forrageiras crescidas no Brasil (Baldani et al., 1986a). Sua disseminação ainda não é clara, podendo ocorrer através da propagação vegetativa, como no caso de *A. diazotrophicus* em plantas de cana-de-açúcar ou por sementes. A disseminação por propagação vegetativa foi confirmada pela presença de bactérias em plantas de cana-de-açúcar

originadas por processos de micropropagação, nos quais o meristema apical foi cuidadosamente extraído (Olivares et al., 1996).

A descoberta de diazotróficos endofíticos, que colonizam um número elevado de raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar e outras gramíneas, mudou o conceito de associações rizosféricas. Essa descoberta permitiu explicar grande potencial da contribuição dos diazotróficos para o suprimento de nitrogênio às culturas de cana-de-açúcar, pois em certas variedades dessa planta, a fixação de nitrogênio por essa bactéria pode ser suficiente para suprir três vezes a média atual da produtividade brasileira (60 ton ha^{-1}), desde que os demais nutrientes e água não sejam fatores limitantes (Franco e Döbereiner, 1994; Canuto et al., 2003; Marques et al., 2003; Olivares et al., 2006; Silva et al., 2006)

2.5. Interação entre fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas endofíticas

A presença de bactérias isoladas de esporos de fungos micorrízicos tem sido reportada ao longo dos anos (Varma et al, 1981; Li e Huang, 1987; Li e Castellano, 1987; Bianciotto et al., 1996). Esses autores descreveram a localização de uma bactéria pertencente ao gênero *Burkholderia* dentro do citoplasma da micorriza arbuscular *Gigaspora margarita*.

A transmissão de bactérias diazotróficas para plantas pode estar relacionada à presença de FMAs, como demonstrado por Paula et al. (1991). Segundo estes autores, as bactérias estão presentes em esporos de fungos micorrízicos, mas ainda se desconhece sua função. Além disso, também foi detectada a presença de várias bactérias diazotróficas em esporos de *Glomus clarum*.

Inoculação de esporos esterilizados de FMAs e *A. diazotrophicus* ou uma mistura de diazotróficos, incluindo *G. diazotrophicus*, *Klebsiella* e outros, foi realizada em plantas de sorgo sacarino, batata doce e cana-de-açúcar. Com a inoculação de ambos os microrganismos, o número de diazotróficos dentro das raízes esterilizadas superficialmente de batata doce e de cana-de-açúcar foi significativamente maior quando comparado aos tratamentos que não houve inoculação ou somente inoculação de diazotróficos (Paula et al., 1991).

Paula et al. (1993) e colaboradores fizeram um levantamento da ocorrência da bactéria associada aos esporos de FMAs na cultura da batata doce, colhidos a partir de plantios comerciais, e verificaram que além dessa espécie, *Klebsiella* sp. e *A. lipoferum* também estavam presente nos esporos lavados ou mesmo desinfestados superficialmente.

Reis et al. (1999), trabalhando com cana-de-açúcar, demonstraram que a bactéria diazotrófica endofítica *Acetobacter diazotrophicus* estava presente em amostras colhidas a partir de raízes e nos esporos de FMAs nativos e lavados com água estéril.

Isopi et al. (1995) avaliaram o efeito de FMAs e *G. diazotrophicus* em plantas de sorgo e verificaram que as bactérias diminuíram a porcentagem de colonização micorrízica, entretanto, os fungos micorrízicos aumentam a infecção por diazotróficos nas raízes, colmos e folhas. O teor de N também aumentou nas plantas, especialmente na presença de ambos os microrganismos, os quais também interferiram no tamanho das raízes que se tornam mais comprimidas e ramificadas.

Os possíveis mecanismos da interação entre FMAs e bactérias diazotróficas endofíticas pode ser devido ao fato de que durante o processo de penetração das hifas infectivas pode ocorrer maior exudação de nutrientes pela planta, acelerando o crescimento de bactérias diazotróficas (Paula et al., 1991). Os efeitos benéficos propiciados pela interação também podem ser devido ao incremento na absorção de P pelas plantas micorrizadas, propiciando melhores condições para o estabelecimento da associação com diazotróficos, o que representa alto custo energético (Pacovsky, 1989).

Também na cultura de trigo foi confirmado que os fungos micorrizos são agente transmissor de bactérias diazotróficas endofíticas (Vazque e Barea, 2000; Sala, 2002)

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no Campus Leonel Brizola da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, localizada no município de Campos dos Goytacazes - RJ (Latitude = 21° 19' 23"; longitude = 41° 10' 40"; altitude = 14 m), no período de 04/05/2006 a 30/07/2006. Diariamente foram registrados os valores de temperatura máxima e mínima no interior da casa de vegetação. As temperaturas diárias máximas variaram de 34,5 a 24,3 °C, com médias de 29,4 °C e as temperaturas diárias mínimas entre 19,3 a 13,0°C, com médias 16,4 °C.

3.1. Delineamento experimental

O delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados, em arranjo fatorial 3 x 3 x 3, sendo três doses de fósforo (0, 50, e 200 mg kg⁻¹); duas espécies de fungos: *Glomus clarum* (Nicolson e Schenck) e *Glomus etunicatum* (Becker e Gerdemanm) e sem micorriza; duas espécies de bactérias endofíticas: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (estirpe PAL-5) e *Herbaspirillum seropedicae* (estirpe HRC54) e sem bactéria, com três repetições.

A unidade experimental foi composta por vaso plástico contendo 4 L de substrato e duas plantas por vaso.

3.2. Características do substrato

O substrato utilizado para produção das mudas foi composto por uma mistura de solo peneirado em malha de 2 mm e areia na proporção de 1:2 (v/v).

Após a mistura, o substrato foi esterilizado em autoclave por uma hora, duas vezes, a uma temperatura de 121°C, para a eliminação de possíveis FMAs e bactérias nativas do substrato.

Tabela 1. Características químicas do substrato

pH ³	P ¹ Mg/dm ³	K ¹	Ca ²	Mg ²	Al ²	H+Al ¹	Na	C	MO	S.B	T	t	m	V	Fe	Cu	Zn	Mn
					Cmolc/dm ³			%	g/dm ³		Cmolc/dm ³		%					
5,3	5	62	0,8	0,6	0,1	3,2	0,04	0,63	10,9	1,6	4,8	1,7	6	33	70,2	0,3	2,2	12,9

¹ Extrator Carolina do Norte; ³ pH – pH em H₂O; ² Extrator KCl 1N; ⁴ Extrator acetato de Cálcio 1N pH 7,0; S.B - Soma de Base; M - Saturação de Alumínio; T- CTC a pH 7; V - Saturação de Base; t - CTC Efetiva; MO - Matéria Orgânica

Foram adicionados 103 mg kg⁻¹ de K no substrato, utilizando como fonte o KCl e KH₂PO₄. As fontes de fósforo utilizadas foram KH₂PO₄ e NaH₂PO₄. Após a aplicação das doses de P (0, 50, 200 mg de P kg⁻¹ de solo), os vasos foram umedecidos e incubados por um período de 40 dias.

3.3. Preparo dos inóculos dos fungos micorrízicos

O substrato utilizado para o preparo do inóculo consistiu em uma mistura de solo e areia na proporção de 1:2 (v/v). O mesmo foi esterilizado em autoclave por duas vezes, a uma temperatura de 121°C, por uma hora, o qual foi colocado em vasos de cultivo com 4 dm³ de volume e inoculado com uma mistura de solo, contendo esporos e raízes colonizadas (50 g de inóculo) com o fungo de cada espécie a ser estudada: *Glomus clarum* (Nicolson e Schenck) e *Glomus etunicatum* (Becker e Gerdemanm).

Para a multiplicação do inóculo, foram semeadas sementes de *Brachiaria bryzantha*, cuja superfície foi desinfetada com solução de 0,5% de hipoclorito de sódio, durante 15 minutos. Após a embebição, as mesmas foram lavadas com água esterilizada, por quatro vezes consecutivas. Após o plantio, os vasos foram mantidos em casa de vegetação por um período de quatro meses, depois as plantas de *Brachiaria bryzantha* foram podadas e os vasos foram tampados com jornal, sem irrigação, por um mês, para facilitar a esporulação dos fungos. Transcorrido esse período, os inóculos foram conservados em câmara fria a 4°C até a instalação do experimento.

3.4. Preparo dos inóculos das bactérias diazotróficas

Foram utilizadas as bactérias diazotróficas endofíticas pertencentes às espécies *Gluconacetobacter diazotrophicus* (estirpe PAL5), *Herbaspirillum seropedicae* (estirpe HRC54), oriundas da Coleção de Culturas da *Embrapa Agrobiologia*. (Tabela 1).

Tabela 2- Origem e designação das estirpes de bactérias endofíticas diazotróficas utilizadas.

Nome Científico	Estirpe	Origem	Referências
<i>G. diazotrophicus</i>	PAL5(*)CNPAB 49037	<i>Saccharum</i> spp., raiz Pernambuco, Brasil	Cavalcante e Döbereiner, 1988
<i>H. seropedicae</i>	HRC54	<i>Saccharum</i> spp., raiz Seropédica, RJ	Baldani et al., 1996

(*) BR (Coleção do CNPAB)

Os inoculantes foram preparados a partir de colônias isoladas, crescidas em pré-inóculo em 5 mL de meio de cultivo líquido Dygs contendo (g L⁻¹): glicose, 2; ácido málico, 2; peptona bacteriológica, 1.5; extrato de levedura, 2; K₂HPO₄, 0.5; MgSO₄.7H₂O, 0.5; ácido glutâmico, 1.5. Esse pré-inóculo foi utilizado para produzir um volume maior de inoculante (1,5 L de meio líquido Dygs), crescidos até atingir uma densidade óptica de aproximadamente 1,0 a 560 nm, significando uma densidade de células superior a 10⁸ por mL.

3.5. Produção dos toletes

Para a produção dos mini-toletes foram cortados 80 colmos da variedade RB72454, em áreas da UFRRJ – Campus Leonel Miranda, Campos dos Goytacazes-RJ, os quais foram cortados em mini-toletes contendo uma única gema do terço superior do colmo. As gemas selecionadas foram submetidas ao processo de termoterapia utilizando banho-maria com capacidade para 21 litro de água, com circulação e controle de temperatura, modelo 500/4DE. As gemas foram acondicionadas em saquinhos de nylon (tipo saco de batata), os quais foram tratadas com água quente a 51°C, por uma hora. Após resfriamento, as mesmas foram pregerminadas em bandejas plásticas, 46,7 x 30,2 x 11 cm

(largura x comprimento x altura), utilizando como substrato areia lavada e esterilizada previamente por duas horas em autoclave, a 121 °C.

Após a germinação dos mini-toletes foi realizado o transplântio nos vasos já adubados com as três doses de fósforo, 0, 50, 200 mg L⁻¹. No momento do plantio foram inoculados os FMAs com uma mistura de solo, contendo esporos e raízes colonizadas (50 g de inóculo) com o fungo de cada espécie a ser estudada: *Glomus clarum* (Nicolson e Schenck) e *Glomus etunicatum* (Becker e Gerdemanm). A inoculação com as bactérias diazotróficas endofíticas foi realizada adicionando-se 5 mL da cultura bacteriana diretamente sobre as raízes das mudas de cana-de-açúcar no momento em que foram transplântadas para os vasos.

3.6. Colheita

As plantas foram coletadas (parte aérea e raiz) aos 90 dias após o transplântio. As raízes das plantas foram lavadas primeiro com água de torneira e depois com água desionizada. As amostras das raízes mais finas foram acondicionadas em vidros de 10 ml contendo álcool 50% para determinação da porcentagem de colonização e outra amostra de 1 g de massa fresca lavadas com água esterilizada para contagem de bactérias. A parte aérea e a raiz foram colocadas individualmente em sacos de papel e em seguida colocadas em estufa de ventilação forçada, a uma temperatura de 65°C por 48 horas.

3.7. Variáveis analisadas

3.7.1. Produção de matéria seca

A parte aérea e as raízes, após a secagem, foram pesadas para determinação biomassa seca, em seguida trituradas em moinho do tipo Willey e armazenadas em frasco hermeticamente fechado.

3.7.2. Análise nutricional da parte aérea

Foram determinados os teores de N, P, K, Ca e Mg, na parte aérea. Para isso, o material vegetal foi submetido à oxidação pela digestão sulfúrica, onde foi obtido o extrato, no qual foi determinado o nitrogênio pelo método de Nessler (Jackson, 1965), o fósforo pelo método colorimétrico do molibdato (Malavolta et al., 1997) e o potássio por fotometria de emissão de chama. O Ca e Mg foram quantificados após oxidação do material vegetal pela digestão nitro-perclórica, por espectrofotometria de absorção atômica.

3.7.3. Porcentagem de colonização micorrízica

As mostras de raízes finas acondicionada nos vidros de 10ml foram coloridas segundo o método azul de metil (Grace et al., 1991) adaptado. Foram depositados 10 pedaços de raízes coloridas, com auxílio de uma pinça, sobre lâminas, onde adicionou-se algumas gotas de glicerol ácido sobre as raízes e as mesmas foram cobertas por uma lamínula. As raízes foram levadas ao microscópio para a observação da presença de estruturas de FMAs.

3.7.4. Contagem de bactérias diazotróficas endofíticas através da técnica do Número Mais Provável (NMP)

A contagem da população bacteriana endofítica foi realizada pelo método NMP, em amostras frescas de 1g de raízes mais finas, posteriormente trituradas em 9 mL de solução salina (NaCl) a 85%. Foram realizadas diluições seriadas de 10^{-2} a 10^{-6} e uma alíquota de 0,1 mL inoculada em meio de cultura semi-sólido LGI-P caldo (semi-específico para contagem de *Gluconacetobacter diazotrophicus*) e JNFb (semi-específico para contagem de *Herbaspirillum* spp.), sem nitrogênio, descrito por Dobereiner et al. (1995).

Foram utilizadas três repetições de inoculação em meio semi-sólido por diluição e a contagem do número de bactérias foi baseada na presença ou ausência de película característica utilizando-se a tabela de McCrady.

3.7.5. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e a comparação entre as médias dos tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foi utilizado o Sistema de Análise Estatística (SANEST), desenvolvido pelo CIAGRI (Centro de Informática na Agricultura) da Universidade de São Paulo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA)

Para a variável MSPA, verificou-se efeito significativo da interação dos fatores doses de fósforo e bactérias endofíticas (Tabela 2). Na ausência de adubação fosfatada, os tratamentos inoculados com *G. diazotrophicus* estirpe PAL5 e *H. seropedicae* estirpe HRC54 promoveram incrementos na MSPA de 15,8% e 16,7%, respectivamente, em relação ao controle. Entretanto, quando se adicionou P não houve influência das bactérias na produção de MSPA.

Em plantas não inoculadas com bactérias diazotróficas a aplicação de P aumentou a produção de matéria seca das mesmas.

Tabela 2. Produção de matéria seca da parte aérea (g vaso^{-1}) das plantas de cana-de-açúcar em função das doses de P e inoculados de bactérias diazotróficas e FMAs. Média de 3 repetições.

P(mg kg^{-1})	Bactérias			FMAs			Média
	Gd PAL 5	Hs HRC 54	S/Bact.	<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus etunicatum</i>	S/FMAs	
0	26,3 a A	26,5 a A	22,7 b B	26,3	24,6	24,6	25,1 B
50	28,8 a A	29,9 a A	30,3 a A	29,9	29,8	29,3	29,7 A
200	30,0 a A	29,0 a A	31,0 a A	29,7	30,8	29,5	30,0 A
Médias	28,4	28,5	28,0	28,6 a	28,4 a	27,8 a	28,3
C.V.	12%						

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Gd - *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5

Hs - *Herbaspirillum seropedicae* HRC54

Alguns autores (Oliveira et al., 2003; Canuto et al., 2003; Ferreira, 2002), trabalhando com cana-de-açúcar, também observaram incrementos na produção de matéria seca da parte aérea, em resposta à inoculação com bactérias

diazotróficas. Oliveira et al. (2005), avaliando a inoculação de estirpes selvagens e mutante *nif⁻* (fenótipo não fixador) de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar (variedade SP70-1143), concluíram que as plantas inoculadas com a estirpe PAL5 apresentaram um aumento de 25,5% na produção de matéria seca da parte aérea, em relação à não inoculada.

As respostas de produção de MSPA ao incremento de P foram baixas, tanto para plantas inoculadas com fungos como para bactérias. Tais comportamentos podem ser explicados pelos baixos teores de N na planta com médias de 4,6 a 6,1 g kg⁻¹ (Tabela 1A) nos diferentes tratamentos no período de condução do experimento. Esses teores são considerados muito baixos comparados com a faixa adequada para cana-de-açúcar que pode variar de 18 a 25 g kg⁻¹ (Raj et al., 1997). A inoculação com bactérias diazotróficas não foram eficientes para aumentar o teor de N na planta para a faixa adequada e, conseqüentemente, limitou o crescimento das plantas independente da aplicação ou não de P no solo ou do uso dos FMAs.

A análise de variância mostrou que para a produção de MSPA não houve diferença significativa entre as espécies de fungo e as doses de P. Os valores médios com a aplicação do P no solo encontra-se na Tabela 2.

Andreola et al. (1985), estudando o efeito de seis espécies de fungos micorrízicos arbusculares sobre o desenvolvimento de três variedades de cana-de-açúcar, concluíram que a eficiência da inoculação pode variar de acordo com a espécie de FMAs e com a variedade da cana-de-açúcar. Siqueira e Franco (1988) relatam que poucos estudos sobre micorrização em cana-de-açúcar têm sido realizados, principalmente em virtude da sua baixa dependência micotrófica. Entretanto, apesar de Reis et al. (1999) observarem a ocorrência natural de fungos micorrízicos na rizosfera de plantas de cana-de-açúcar sob diferentes condições de solo e manejo, esses autores afirmam que nenhum estudo conclusivo foi realizado sobre influência dos FMAs em cana-de-açúcar durante seu ciclo vegetativo.

4.2. Produção de matéria seca e aspectos anatômicos das raízes.

Para a produção de matéria seca das raízes (MSR) observou-se comportamento semelhante à produção de MSPA, onde houve interação significativa entre os

fatores doses de P e bactérias diazotróficas (Tabela 3). Na dose 0 de P, os incrementos na MSR foram de 49,5% e 17,6% para os tratamentos inoculados com PAL5 e HRC54, respectivamente, em relação ao não inoculado com bactérias.

Os maiores valores de MSR foram observados na dose 200 mg kg⁻¹ de P sem a presença da bactéria, entretanto, não houve diferença significativa entre as doses 50 e 200mg kg⁻¹, independente da inoculação da bactéria.

Os FMAs não proporcionaram aumentos significativos na produção de MSR. Há pouca informação sobre modificações anatômicas e histoquímica produzidas por colonizações micorrízicas nos tecidos vegetais (Krishna et al.,1981). Há relatos de que os FMAs não provocam grandes transformações morfológicas nas raízes (Cooper, 1984), apesar de que outros (Atkinson et al., 1994) demonstraram que a presença dos FMAs nas raízes podem provocar um aumento na divisão celular e um efeito variável sobre o crescimento das células.

Tabela 3. Produção de matéria seca das raiz (g vaso⁻¹) de plantas de cana-de-açúcar em função das doses de P e inoculados de bactérias diazotróficas e FMAs. Média de 3 repetições.

P(mg kg ⁻¹)	Bactérias			FMAs			Média
	Gd PAL 5	Hs HRC 54	S/Bact	<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus etunicatum</i>	S/FMAs	
0	14,5 a A	11,4abA	9,7 b B	11,4	12,3	11,8	11,8
50	12,6 a A	12,7 a A	14,3 a A	13,4	12,5	13,6	13,2
200	14,3 a A	13,9 a A	16,6 a A	13,7	16,2	14,9	14,9
Médias	13,8	12,6	13,5	12,8	13,7	13,4	13,3
C.V.	26%						

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Gd.- *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5

Hs.- *Herbaspirillum seropedicae* HRC54

Os resultados significativos das bactérias com a aplicação do P no solo, tabela 3, podem indicar um efeito positivo da inoculação sobre a geometria do sistema radicular, seja pelo incremento dos pêlos radiculares ou pelo aumento da proporção de raízes finas (Olivares, 1997; Baldani et al., 1999; Salas, 2002; Ferreira, 2002). Estes aspectos podem ser observados nas fotos apresentadas abaixo na Figura 3.

Resultados encontrados por Canuto (2003) em plantas de cana-de-açúcar inoculadas com as bactérias diazotróficas PAL3, HRC54, PAL5, HCC103 e

HRC80 demonstraram uma tendência de maior volume radicular, embora não tenham diferido estatisticamente das plantas não inoculadas. Muñoz-Rojas e Caballero-Mellado (2003), estudando cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com *G. diazotrophicus* estirpe PAL5, observaram incrementos no volume radicular quando comparada com o tratamento controle.

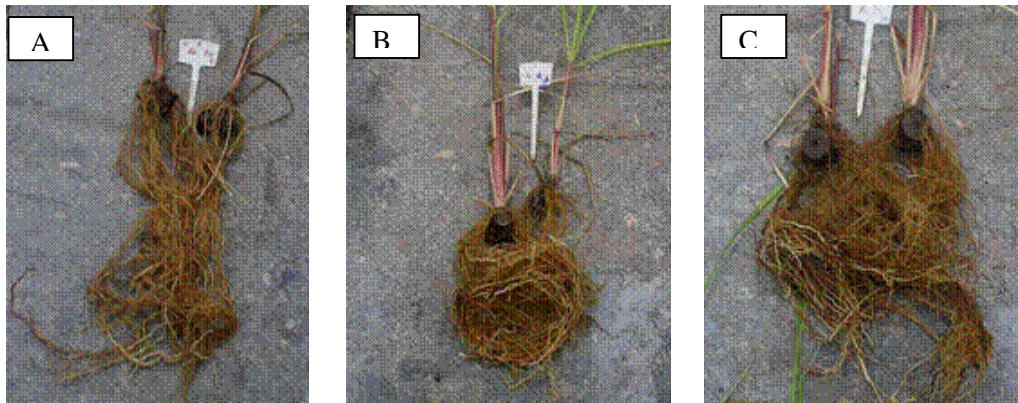


Figura 3: Tratamento controle (A), planta inoculada com PAL5 (F0 B1 D0) (B) e planta inoculada com HRC54 (F0 B2 D0) (C).

Os efeitos da inoculação de algumas estirpes de bactéria no crescimento das plantas podem estar associados ao processo de fixação biológica do N^2 atmosférico (FBN) à síntese de hormônios de crescimento produzidos por bactérias ou mesmo a um efeito sinérgico desses fatores atuando nos diferentes estádios de desenvolvimento das plantas. Os fitormônios, principalmente o ácido indol-acético (AIA), excretado por *Azospirillum*, desempenha papel essencial na promoção de crescimento das plantas (Bashan e Holguin, 1997).

Os resultados indicam que houve influência da inoculação com *G. diazotrophicus* (PAL5) e *H. seropedicae* (HRC54) sobre o crescimento das plantas de cana-de-açúcar na ausência de adubação fosfatada no período avaliado. Este efeito ocorreu sobre a matéria seca das raízes e da parte aérea, o que pode estar relacionado à existência de efeitos associados à produção de fitormônios ou efeitos derivados de contribuições da FBN. Como discutido anteriormente, os teores de N na planta, por estarem baixos do adequado, podem ter limitado o crescimento das plantas.

4.3. Porcentagem de colonização micorrízica

As doses de P e as espécies de FMAs influenciaram a colonização micorrízica nas raízes das plantas (Tabela 4). Nos tratamentos inoculados com *Glomus clarum* e *Glomus etunicatum* houve um decréscimo de 81,1 para 41,1% e de 84,4 para 67,8%, respectivamente, na porcentagem de colonização com o incremento de P no solo de 0 para 200 mg kg⁻¹.

Tabela 4. Colonização micorrízica (%) em raízes de cana-de-açúcar em função das doses de fósforo e espécie de fungo micorrízico. Média de 3 repetições.

Fungos	P (mg kg ⁻¹)			Média
	0	50	200	
<i>G. clarum</i>	81,1 a A	51,1 b A	41,1 b A	57,8
<i>G. etunicatum</i>	84,4 a A	57,8 ab A	67,8 b B	70,0
Sem fungo	0,0 a B	0,0 a B	0,0 a C	0,0
C.V %	34%			

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Alguns autores (Andreola et al., 1985; Nogueira 1997; Costa et al., 2001; Freitas 2003) observaram em diversas culturas, como cana-de-açúcar, soja, acerola e menta, respectivamente, que a eficiência da simbiose depende da disponibilidade de fósforo no solo, da espécie do fungo e do genótipo da planta.

Com relação à espécie *Glomus clarum*, resultados semelhantes ao encontrado no presente trabalho foram observados também por Takahashi (2005) e Haridoim (2006), em cana-de-açúcar. O primeiro autor observou que com 8 semanas de cultivo, a porcentagem de colonização micorrízica foi de 2,1 vezes maior quando as plantas foram cultivadas em baixas doses de P (20 mg P kg⁻¹) em relação à dose 200 mg kg⁻¹. O segundo autor, estudando o efeito de herbicidas no desenvolvimento de micorrizas em cana-de-açúcar, com 12 semanas de cultivo, observou que a taxa de colonização foi dependente da concentração de fósforo no solo, independentemente dos herbicidas utilizados. As plantas cultivadas em baixas doses de P (20 mg P kg⁻¹) apresentaram colonização 2 vezes maior que as cultivadas em maiores doses (200 mg P kg⁻¹).

Para a espécie *Glomus etunicatum*, Freitas (2006) observou efeito quadrático, com incremento de 39 para 65% na porcentagem de colonização micorrízica, com o aumento na dose de P até 90 mg de P kg⁻¹, ocorrendo uma

diminuição na mesma para as doses maiores que 200 mg de P kg⁻¹. Resultados diferentes foram observados no presente trabalho, onde a maior porcentagem de colonização foi verificada na menor dose de P e com o incremento nas doses de P, ocorreu decréscimo na porcentagem de colonização. Esses resultados possivelmente ocorreram em função das diferentes combinações fungo-planta, já que Freitas (2006) trabalhou com menta e o presente trabalho com cana-de-açúcar.

4.4. Contagem de bactérias diazotróficas endofíticas através da técnica do Número Mais Provável (NMP)

A presença das bactérias *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL5 e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54, avaliadas nas raízes de cana-de-açúcar, pode ser observada na Tabela 5. As espécies de FMAs e a adubação fosfatada influenciaram no estabelecimento das bactérias no tecido radicular de cana-de-açúcar para a bactéria *G. diazotrophicus* estirpe PAL5, todavia para a *H. seropedicae* estirpe HRC54 não foi observada influência dessas variáveis.

As bactérias diazotróficas endofíticas não estão separadas dos FMAs, podendo resultar em competição por nutrientes entre os dois microorganismos. Segundo Biro et al. (2000), o sucesso da co-inoculação depende do estado fisiológico, do tempo de colonização ou da demanda nutricional dos microsimbiontes.

Observa-se, também, que a bactéria *H. seropedicae* apresentou maior resposta à inoculação em relação à bactéria *G. diazotrophicus*, o que pode ser explicado pela época de plantio do experimento (período de inverno), no qual ocorrem baixa luminosidade e temperaturas menores em relação ao verão. A bactéria *H. seropedicae* utiliza como fonte de carbono principalmente o ácido málico, não influenciando a concentração de sacarose, diferentemente da bactéria *G. diazotrophicus*, que utiliza meio de cultivo rico em sacarose (10%) (Reis et al., 1999 a). Resultados semelhantes foram relatados por Ferreira (2002 e Reis et al. 1999).

Em um trabalho realizado por Reis et al. (1999) nos Estados do Rio de Janeiro e Pernambuco, em condições de campo, verificou-se a ocorrência de *G. diazotrophicus* em raízes frescas de diferentes variedades de cana-de-açúcar com um número de células por grama de matéria fresca de 10⁻⁴ a 10⁻⁶.

Tabela 5. Número de bactérias diazotróficas endofíticas através da técnica do Número Mais Provável (NMP), obtidas em raízes de cana-de-açúcar. Média de 3 repetições.

Inoculação com Bactéria	Inoculação com Fungo	<i>G. diazotrophicus</i> P mg kg ⁻¹			<i>H. seropedicae</i> P mg kg ⁻¹		
		0	50	200	0	50	200
S/Bactérias	S/Fungo	5,0x10 ³	n.a	1,8x10 ³	5,8x10 ³	n.a	3,1x10 ³
S/Bactérias	<i>G. clarum</i>	5,8x10 ²	n.a	6,3x10 ⁴	6,2x10 ⁴	n.a	2,1x10 ³
S/Bactérias	<i>G. etunicatum</i>	4,0x10 ³	n.a	3,0x10 ²	2,5x10 ⁴	n.a	2,1x10 ⁴
G.d. PAL5	S/Fungo	5,0x10 ⁴	7,3x10 ⁴	5,2x10 ⁵	n.a	n.a	n.a
G.d. PAL5	<i>G. clarum</i>	8,1x10 ⁵	2,7x10 ⁴	9,8x10 ⁴	n.a	n.a	n.a
G.d. PAL5	<i>G. etunicatum</i>	5,8x10 ⁴	4,0x10 ⁵	6,0x10 ⁴	n.a	n.a	n.a
H.s.HRC54	S/Fungo	n.a	n.a	n.a	9,1x10 ⁴	4,5x10 ⁵	1,2x10 ⁵
H.s.HRC54	<i>G. clarum</i>	n.a	n.a	n.a	2,4x10 ⁵	4,5x10 ⁵	2,2x10 ⁵
H.s.HRC54	<i>G. etunicatum</i>	n.a	n.a	n.a	5,7x10 ⁵	4,0x10 ⁵	4,5x10 ⁵

n.a.: Não analisado.

Polidoro et al. (2001), em levantamento sobre a contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura da cana-de-açúcar no Brasil observaram que as variedades comerciais de cana-de-açúcar RB 72454 e SP 801842 apresentaram um elevado potencial para a FBN nas lavouras amostradas. No entanto, o manejo da fertilidade do solo e a nutrição das plantas apresentaram tendência de influenciar na magnitude da contribuição, sendo necessário o monitoramento do estado nutricional das plantas, principalmente micronutrientes, pois os mesmos, em geral, não são aplicados nas lavouras comerciais da cultura da cana-de-açúcar. Esses mesmos autores destacam que entre os micronutrientes, a limitação na nutrição molibídica pode ser a mais importante pelo seu papel nos processos envolvidos na nutrição nitrogenada das plantas de cana-de-açúcar.

4.5. Conteúdos de N, P, K, Ca, Mg na parte aérea da mudas de cana-de-açúcar.

4.5.1. Conteúdo de N na parte aérea.

O conteúdo de N na parte aérea das mudas de cana-de-açúcar foi influenciado pelas doses de P e pelos fungos micorrízicos (Tabela 6). Observa-se incremento de 10 e 22% no conteúdo de N para as doses 50 e 200 mg de P kg⁻¹, respectivamente, em relação a dose 0 mg de P kg⁻¹. A inoculação com os fungos *G. clarum* e *G. etunicatum* proporcionaram incrementos no conteúdo de N de 7,2 e 5,0%, respectivamente, em relação ao tratamento sem inoculação com o fungo.

Nogueira (1997), avaliando diferentes espécies de FMAs e diferentes doses de P em soja, observou resultados semelhantes ao encontrado no presente trabalho. Segundo esse autor, o incremento das doses de P proporcionou aumento no conteúdo do N da parte aérea da soja.

Pereira et al. (1996), observaram que as plantas micorrizadas apresentaram teores de nitrogênio até 2,6 vezes maior que as plantas controle e que esse resultado seria pela melhor absorção do N via fungo micorrízico.

A inoculação com as bactérias diazotróficas *G. diazotrophicus* e *H. seropedicaes* não proporcionaram aumentos nos conteúdos de N da parte aérea das plantas (tabela 6), a pesar de as bactérias terem sido observadas nas raízes da cana-de-açúcar em todos os tratamentos (Tabela 5). A não eficiência das bactérias diazotróficas endofíticas pode estar relacionada aos baixos teores de N observados na parte aérea das plantas analisadas (Tabela 1^A - apêndice), muito inferiores aos teores sugeridos por Raji et al. (1997), que variam entre 18 e 25 g kg⁻¹. Também temperaturas baixas observadas durante a condução do experimento (Figura 2A - apêndice) podem ter influenciado as bactérias em fixar o N₂ atmosférico. Segundo Gillis et al. (1989), a temperatura ótima de crescimento e fixação de N₂ é de 30°C.

Tabela 6. Conteúdo de N da parte aérea (mg vaso⁻¹) das plantas de cana-de-açúcar em função das doses de P e inoculados de bactérias diazotróficas e FMAs. Média de 3 repetições.

P(mg kg ⁻¹)	Bactérias			FMAs			Média
	Gd PAL 5	Hs HRC 54	S/Bact	<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus etunicatum</i>	S/FMAs	
0	134,1	136,0	132,4	139,8	133,1	129,7	134,2 C
50	144,7	150,3	148,3	150,9	147,9	144,5	147,8 B
200	163,7	154,3	171,4	167,8	168,0	153,5	163,2 A
Médias	147,5	146,9	150,7	152,8 a	149,7 a b	142,6 b	148,4

10%

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

G.d. *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL5.

H.s. *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54.

O nitrogênio representa o nutriente mais exigido pelas culturas, uma vez que está presente na estrutura molecular de aminoácidos, ácidos nucléicos, pigmentos e metabólitos secundários (Marschner, 1995; Taiz e Zeiger, 2004). Portanto, a deficiência desse nutriente rapidamente inibe o crescimento vegetal. Segundo Cuellar et al. (2002), o nitrogênio influencia a produção de colmos e

matéria seca das mudas de cana-de-açúcar, proporcionando maior qualidade das mesmas.

4.5.2. Conteúdo de P na parte aérea.

A inoculação com bactérias diazotróficas endofíticas e FMAs não proporcionaram aumentos no conteúdo de P da parte aérea das plantas (Tabela 7). Possivelmente, a alteração na anatomia do sistema radicular provocada pela inoculação com bactérias diazotróficas (Figura 3), que aumentou o número de pêlos absorventes e raízes finas minimizou os efeitos benéficos dos FMAs. O principal benefício dos FMAs é o aumento da absorção de nutrientes de baixa mobilidade no solo, através do micélio externo do fungo que atua como uma extensão do sistema radicular (Harley e Smith, 1983).

Com o incremento das doses de P observou-se que o aumento no conteúdo de fósforo na parte aérea é de 163 e 529%, maior em relação à dose 0 mg de P kg⁻¹, para doses 50 e 200 mg de P kg⁻¹, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7. Conteúdo de P na parte aérea (mg vaso⁻¹) das plantas de cana-de-açúcar em função das doses de P e inoculados de bactérias diazotróficas e FMAs. Média de 3 repetições.

P(mg kg ⁻¹)	Bactérias			FMAs			Média
	Gd PAL 5	Hs HRC 54	S/Bact	<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus etunicatum</i>	S/FMAs	
0	19,2	21,3	19,0	22,4	19,8	17,3	19,6C
50	48,4	53,5	53,0	50,0	51,7	53,1	51,6 B
200	127,5	121,3	120,8	127,2	123,4	119,0	123,2 A
Médias	65,0	65,3	64,3	66,5	65,0	63,1	64,8
C.V.	19%						

Médias maiúsculas seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste deTukey a 5%

Resultados semelhantes foram encontrados por Takahashi (2005), que observou incremento no conteúdo de P com o aumento na dose de fósforo no solo. Freitas et al. (2006), trabalhando com dose de P e fungos micorrízicos em menta, também observaram incrementos no conteúdo de P com a adição de fósforo no solo.

Os FMAs proporcionam melhor desenvolvimento das mudas, dada a maior absorção de certos nutrientes, principalmente do fósforo, melhor resistência ao estresse hídrico, melhor aclimação de mudas micropropagadas, maior resistência ao transplante e tolerância a patógenos (Jaizme-Vega e Azcón, 1995). Todavia, a eficiência micorrízica depende de vários fatores como: genótipo da

planta, espécie e ecótipo do fungo e disponibilidade de P no solo. Em condições desfavoráveis, a associação pode proporcionar baixo crescimento vegetal, chegando a atingir uma condição de parasitismo, onde o balanço energético se torna desfavorável à planta (Marschner & Dell, 1994). Nesse sentido, Nogueira (1997), trabalhando com duas espécies de fungo, *G. margarita* e *G. intraradices* e doses de P em soja, observou baixas respostas na eficiência destes fungos em promover a absorção e acúmulo de P.

Em condições sub-ótimas de P, a colonização de raízes é alta, geralmente com grandes benefícios para planta. Já em condições extremas, com níveis muito baixos ou muito altos, a interação pode causar redução no crescimento do hospedeiro, resultando na condição de parasitismo (Colozzii-Filho e Siqueira, 1986).

No presente estudo, FMAs não aumentaram a absorção deste elemento em situação de baixas concentrações de P no solo.

4.5.3. Conteúdo de K na parte aérea.

O conteúdo de K na parte aérea das mudas de cana-de-açúcar foi influenciado pelas doses de P no solo (Tabela 8). O conteúdo de K aumentou de 403 para 474 mg vaso⁻¹ de K, da dose 0 para 50 mg de P kg⁻¹ e diminuiu para 328 mg vaso⁻¹ de K na dose 200 mg de P kg⁻¹.

O K é essencial para a ativação da enzima presente nos três grupos enzimáticos mais importantes como sintetases, oxiredutases e transferases, tendo papel decisivo na formação, transporte e acúmulo dos carboidratos, ativação de enzimas que catalisam o metabolismo dos carboidratos e estimula a absorção de água e sua conservação, controlando o movimento estomático (Cuellar et al., 2002).

Ferreira (2002) encontrou resposta significativa no acúmulo de K na parte aérea das mudas de cana-de-açúcar da variedade RB72454 aos 63 dias após inoculação das bactérias diazotróficas *G. diazotrophicus* estirpe PAL5 e *H. seropedicae* estirpe HRC54, de 69,5 e 55,3%, respectivamente em relação ao tratamento controle.

Tabela 8. Conteúdo de K da parte aérea (mg vaso⁻¹) das plantas de cana-de-açúcar em função das doses de P e inoculados de bactérias diazotróficas e FMAs. Média de 3 repetições.

P(mg kg ⁻¹)	Bactérias			FMAs			Média
	Gd PAL 5	Hs HRC 54	S/Bact	<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus etunicatm</i>	S/FMAs	
0	415,7	425,5	367,8	421,6	401,0	386,4	403,0B
50	445,6	461,3	513,5	506,6	403,4	510,2	473,4 A
200	326,4	314,0	342,3	327,0	335,6	302,1	327,5C
Médias	395,9	400,3	407,8	418,4	380,2	405,6	401,3
C.V.				23%			

Médias maiúsculas seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

Freitas et al. (2006), avaliando o efeito dos fungos micorrízicos e das doses de P no crescimento e acúmulo de nutrientes em plantas de menta, observaram que a adição de P promoveu um incremento no conteúdo de N, P, K na parte aérea.

Estudando os efeitos das espécies dos fungos *G. clarum* e *G. margarita* e das doses de P, sobre o crescimento e conteúdo de nutriente em mudas micropropagadas de bananeira, Samarão (1998) concluiu que ambas espécies de fungos nas doses 0 e 10 mg kg⁻¹ de P, proporcionaram aumentos significativos nos conteúdos de P e K da parte aérea das mudas de bananeira e que na dose 50 mg kg⁻¹ não houve diferença significativa em relação ao tratamento controle.

4.5.4. Conteúdo de Ca na parte aérea

Para os tratamentos sem inoculação de bactérias, observaram-se aumentos no conteúdo de Ca para as doses 50 e 200 mg kg⁻¹ de 25 e 39%, respectivamente, comparado com as doses 0 mg P kg⁻¹ (Tabela 9).

Na ausência de adubação fosfatada, os tratamentos inoculados com *G. diazotrophicus* estirpe PAL5 e *H. Seropedicae* estirpe HRC54 promoveram aumento no conteúdo de Ca de 13 e 38%, respectivamente (Tabela 9).

Ferreira (2002), trabalhando com cana-de-açúcar, encontrou resultados similares, com maiores acúmulo de Ca na parte aérea nos tratamento inoculados com a bactéria *H. seropedicae* estirpe HRC54, variedade RB72454. Esse aumento pode ser devido à alteração na geometria radicular das plantas como observado no presente trabalho (Fig. 3), que contribuem para uma melhor exploração do substrato

Tabela 9. Conteúdo de Ca da parte aérea (mg vaso^{-1}) em função das doses de P (mg kg^{-1}) e tratamentos de bactérias diazotróficas. Média de 3 repetições.

P(mg kg^{-1})	Bactérias			Média
	PAL5	HRC54	S/Bact	
0	67,5 b A	82,4 a A	59,5 b B	69,8
50	71,3 a A	72,1 a A	74,3 a A	72,5
200	73,1 a A	70,1 a A	82,7 a A	75,3
Médias	70,7	74,9	72,1	72,5
C.V.	16%			

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Para o Ca verificou-se efeito significativo da interação dos fatores doses de fósforo e FMAs (Tabela 10), com os maiores valores no conteúdo de Ca nos tratamentos sem inoculação de FMAs.

Tabela 10. Conteúdo de Ca da parte aérea (mg vaso^{-1}) em função das doses de P (mg kg^{-1}) e tratamentos com FMAs. Média de 3 repetições.

P (mg kg^{-1})	Fungos			Média
	<i>G. clarum</i>	<i>G. etunicatum</i>	S/FMAs	
0	70,6 ab A	59,0 b B	79,8 a AB	69,8
50	69,2 a A	75,7 a A	72,6 a B	72,5
200	71,6 b A	68,2 b AB	86,1 a A	75,3
Médias	70,5	67,2	79,5	72,5
C.V.	16%			

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Nogueiras (1997), trabalhando com duas espécies FMAs e doses de P na cultura de soja, encontrou as maiores acumulações de Ca na parte aérea, em doses 200 mg kg^{-1} sem inoculação de fungos micorrizos.

Os efeitos dos FMAs nos teores de K, Ca, Mg e S são pouco consistentes, podendo, aumentar, diminuir ou, algumas vezes, não serem afetados pela micorrização (Siqueira et al. 1994).

4.5.5. Conteúdo de Mg na parte aérea

O conteúdo de Mg na parte aérea foi influenciado pelos tratamentos inoculados com bactérias diazotróficas endofíticas e FMAs (Tabela 9). Observou-se que quando as mudas de cana-de-açúcar foram inoculadas com os fungos *G. clarum* e *G. etunicatum*, sem a inoculação das bactérias, houve incremento no

conteúdo de Mg de 56 e 49%, respectivamente, quando comparado com o tratamento controle sem fungo e sem bactéria.

A aquisição de elementos minerais pelas plantas ocorre em função da morfologia radicular e da eficiência dos mecanismos de absorção (Marschner, 1995; Epstein e Bloom, 2006). O magnésio é um macronutriente constituinte da molécula de clorofila e ativa mais enzimas que qualquer outro nutriente mineral, entre essas ativações de enzimas as mais importantes são aquelas envolvidas na transferência de energia via adenosina trifostato (ATP) (Epstein e Bloom, 2006).

Tabela 11. Conteúdo de Mg da parte aérea (mg vaso^{-1}) em função de tratamentos de bactérias diazotróficas e FMAs. Média de 3 repetições.

Fungos	Bactérias			Média
	PAL5	HRC54	S/Bact	
<i>G. clarum</i>	57,2 a.A	58,0 a A	65,3 a A	60,2
<i>G. etunicatum</i>	55,7 a A	60,0 a A	62,3 a A	59,3
S/ fungo	56,5 a A	60,1 a A	41,8 b B	52,8
C.V %	56,4	59,4	56,5	57,4
C.V.	20%			

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Nogueira (1997), estudando a associação de duas espécies de fungos micorrízicos arbusculares e a soja, submetidas a doses crescentes de P, observou que a presença dos fungos aos 60 dias, em combinação com doses 50, 100, 200 mg kg^{-1} de P, ocasionou diminuição na quantidade total de Mg absorvido.

As interações bactéria-fungo-planta-fertilizante são bastante específicas, havendo necessidade de conhecer a influência dos diversos fatores, abióticos e bióticos, para o sucesso da interação e melhor manejo das culturas (Salas, 2005).

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Conduziu-se um experimento em casa de vegetação com o objetivo de avaliar a interação de bactérias diazotróficas endofíticas, fungos micorrízicos arbusculares e doses de fósforo no desenvolvimento de mudas de cana-de-açúcar (variedade RB72454), após o tratamento térmico. O delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados, em arranjo fatorial 3 x 3 x 3, com doses de fósforo (0, 50, e 200 mg kg⁻¹); duas espécies de fungos: *Glomus clarum* (Nicolson e Schenck) e *Glomus etunicatum* (Becker e Gerdemann) sem micorriza; duas espécies de bactérias endofíticas: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (estirpe PAL-5) e *Herbaspirillum seropedicae* (estirpe HRC54), e sem bactéria, com três repetições. A unidade experimental foi composta por um vaso plástico de 4L com duas plantas, contendo uma mistura de solo e areia, na proporção de 1:2 (v/v) esterilizado em autoclave. As plantas foram coletadas aos 90 dias após transplântio e determinou-se peso da matéria seca da raiz e parte aérea, porcentagem de colonização micorrízica, contagem de bactérias diazotróficas endofíticas através da técnica do Número Mais Provável (NMP) e o conteúdo de N, P, K, Ca, Mg da parte aérea.

Diante dos resultados obtidos conclui-se que:

- Na ausência de adubação fosfatada, as bactérias diazotróficas, foram benéficas para a produção de matéria seca da parte aérea e da raiz;

- Os FMAs aumentaram os conteúdos de N, Ca, e Mg da parte aérea das plantas, entretanto, não proporcionou aumentos nos conteúdos de P, K;
- As bactérias endofíticas *G. diazotrophicus* PAL5 e *H. seropedicae* HRC54 aumentaram os conteúdos de Ca, Mg, no entanto, não aumentaram os conteúdos de N, P e K;
- Os conteúdos de N, P e K na parte aérea foram maiores com o incremento da adubação fosfatada;
- As espécies de FMAs e a adubação fosfatada influenciam no estabelecimento da bactéria *G. diazotrophicus* PAL5 no tecido radicular da cana-de-açúcar.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, A. G. (1973) *Sugarcane physiology*. Amsterdam: Elsevier, 752
- Alexander, T., Méier, R., Toth, R., weber, H. C. (1988) Dynamics of arbuscules development and degeneration in micorrizas of *Triticum aestivum* L. with reference to *Zea mays* L *New phytologist*, New York. 110(3):363-363.
- Al-Karaki G. N., Al-Raddad A (1997) Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress on growth and nutrient uptake of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Mycorrhiza*,7:83-88
- Andreola, F. (1982) *Micorrizas MVA em cana-de-açúcar*. Teses de mestrado. Piracicaba: USP-ESALQ, 74p.
- Andreola, F., Cardoso, E. J. B. N., Silveira, A. P. D (1985) Efeito de Seis Espécies de Fungos Micorrízicos Vesículo Arbusculares sobre o Desenvolvimento de Três Variedades de cana-de-açúcar. *Tecnologia/Pesquisa STAB- sep-Out*. 35-89.
- Anuário Brasileiro da Cana-de-Açúcar (2005) Gilson R. Da Rosa et al. Santa Cruz Del Sul; Editora *Gazeta Santa Cruz*, 136p.
- Atkinson, D., Berta, G., Hooker, J. E (1994) J.E. Impact of mycorrhizal colonization on root architecture, root longevity and the formation of growth regulators. In: Gianinazzi,S., Schüepp, H. (Eds.). *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*. Birkhäuser: Verlag Basel, 89-99.

- Baldani, J. I., Baldani, V. L. D., Seldin, L., Doebereiner, J (1986 a) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* [INT. J. Syst. Bacteriol.]. 36 (1):86-93.
- Baldani, J. I., de Azevedo, M.S., Reis, V. M., Teixeira, K. R., Olivares, F. L., Gol, S. R., Döbereiner, J. (1999) Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: Avanços e aplicações. In: Siqueira, J. O, ed. *Inter-relação Fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição de Plantas*. Lavras: UFLA/DCS:621-666.
- Baldani, V. L. D., Alvarez, M. A de B., Baldani, J. I., Döbereiner, J. (1986) Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. In the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant and Soil*, Dordrecht, 90 (1): 35-46.
- Boddey, R. M., Urquiaga, S., Alves, B. J. R., Reis, V. M. (2003). Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant and Soil*, 252:139-149.
- Bashan, Y., Holguim, (1997) G. *Azospirillum* plants relations hips: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 43:103-121.
- Benites, P. R. (2004) *Avaliação da resistência de variedades de cana-de-açúcar (saccharum spp.) ao raquitismo-da-soqueira com base na taxa de colonização dos colmos por leifsonia xyli subsp xyli* Dissertação de (Mestrado). Escola Superior Agrícola (Luiz de Queiroz). Universidade de São Paulo. 70p
- Bianciotto, V., Vandi, C., Minerdi, D., Sironi, M., Tichy, H. V., Bofante, P. (1996) An obligately endosymbiotic micorrryzal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Applied and environmental microbiology*, Washington, 62:3005-3010.
- Biro, B.; Koves-pechy, K.; Vors, I.; Takacs, T.; Eggenberg, p.; Strasser, R. J. (2000) interrelations between *Azospirillum* and *Rizobium* nitrogen fixers and arbuscular micorrryzal fungi in the rhizofere of alfafa in sterile, AMF-free or normal soil conditions. *Applied soil Ecology*, 15:159-168.
- Bressan, W., Siqueira, J. O., Vasconcellos, C. A., Purcino, A. A. C. (2001). Fungos micorrízicos e fósforo, no crescimento, nos teores de nutrientes e na produção do sorgo e soja consorciados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36:250-260.

- Bonfantes-Fasolo, P., Perotto, (1991) S. Strategies of micorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytologist*, New York, 119:115-120.
- Bonfantes-Fasolo, P., Perotto (1992) S., Plant and endomycorrhizal fungi: the cellular and molecular basis of their interaction. In: Verma, D.P.S.(Ed) *Molecular signals in plant-microbe communication*. Boca Raton,FL: CRC Press, chap, 14:445-470.
- Canuto, E. L., Oliveira, A. L., Reis, V.M, Baldani, J. I. (2003) Evaluation of the biological nitrogen fixation contribution in sugarcane plants originated from seeds and inoculated with nitrogen-fixing endophytes. *Braz. J. Microbiol*, 34, (1):62-64.
- Castro, P. R. C., Kluge, R. A. (Ed). (2001) *Ecofisiologia de culturas Extrativas: cana-de-açúcar; seringueira; coqueiro; dendezeiro e oliveira*. Cosmópolis: editora *stoller do Brasil*, 138p.
- Catalogo de RB (Janeiro 2005) Programas de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar (PMGCA) das Universidades Federais que formam a RIDESA (Rede Interinstitucional de Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro).
- Cavalcantes, V. A., Döberener, J. A. (1988) new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar cane. *Plant and Soil*, Dordrecht, 108:23-31.
- Cesar, M. A. A. Silva, F. C. (1993) *A cana-de-açúcar como matéria prima para a indústria sucroalcooleira*. Piracicaba. ESALQ, 108p.
- Costa, C. M. C., Maia, L. C. E., Cavalcante, U. M. T., Nogueira, R, J. C. (2001) Influencia de fungos micorrízicos arbusculares sobre o crescimento de dois genótipos de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C) Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília_DF:EMBRAPA 36 (6): 893-901.
- Colozzi-filho, J. A, Siqueiras, J. O. (1986) Micorrizas vasiculo-arbusculares em mudas de cafeeiro. I. Efeitos de *Gigaspora margarita* e adubação fosfatada no crescimento e nutrição. *Revista Brasileira de Ciencias do Solo*, Campinas, 10(3):199-205.
- Cooper, K. M. (1984) Physiology of V. A. Mycorrhizal Associations. In: POWEL, C. L.; BAGYARAJ, J. (Eds.). *VA Mycorrhiza*. Boca Raton: CRC, 155-186.
- Cuellar, I. A., Villegas, R., León, M. E., Perez, H. (2002) Manual de Fertilización de Caña de Azúcar en Cuba. *Publinica*, La Habana, Cuba, 127p.

- Davis, M. J., Bailey, R. A. Ratoon stunting In ; Rott, P.; Bailey, R. A., Comstock, J. C., Croft, B. J., Saumtally, A. S (Ed) (2000) *Aguid to Sucar cane diseases*. Montpellier, CIRAD- ISSCT:49-54.
- Dehne, H. W (1982) Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizas fungi and plants. *Pathogens, psychopathology*,72:1115-1119.
- Dillewijn, C. van. Botany of sugarcane. Waltham: Chronica Botânica, (1952). 371p. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de pesquisa de Solos. Sistema Brasileiro de Classificação de solos. Rio de Janeiro, 412p
- Döbereiner, J. (1959) Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia*. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, 19:251- 258..
- Döbereiner, J., Baldani, V. L. D., Baldani, L. I. (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília: EMBRAPA-SPI; Itaguaaí-RJ: EMBRAPA-CNPAB, 60p.
- Döbereiner, J., Reis, V. M., Paula, M. A., Olivares, F. L. (1993) Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. In: Palacios, R.; Mora, J.; Newton, W.E. eds. *Nitrogen fixation*. Dordrecht; Kluwer Academic Publishers, :671-676.
- Dong, Z., Heydrich, M., Bernard, K., Mecully, M. E. (1994) Further evidence that the N₂-fixing endophytic bacterium from the intercellular spaces of sugarcane stems is *Acetobacter diazotrophicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 61:1843-1846.
- Douds. D. D., Nagahashi, G., Abenay, G. D (1996) Differential effects of cell wall-associated phenolics , cell wall, and cytosilic phenolics of host and non-host root and the growth of two species of A.M fungi. *New phytologist*, New York, 133,(2):289-294.
- Epstein, E., Bloom A. J (2006) *Nutrição Mineral de Plantas: Princípios e perspectivas*, segunda edição, Londrina: Editora Planta, 225-228.
- Ferreira, F. P. (2002) *Promoção de crescimento de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar (Híbridos interespecíficos de Saccharum) por bactérias diazotróficas endofíticas*. Dissertação (mestrado em Biociência e

- biotecnologia) Campos dos Goytacazes. RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense Dancy Ribeiro C.C.T.A. 68p.
- Franco, A., Döbereiner, J. (1994) A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. *Summa phytopathologica*, São Paulo, 20(1):68-74.
- França, A. F. S., Mello, S. Q. S., Rosa, B., Borjas, A. R., Mundim, P. S., Magalhães, M. R. F., Matos, T. R., Reis, J. G. (2004) Avaliação do potencial produtivo e das características químico-bromatológicas de nove variedades de cana-de-açúcar irrigada: 3-8.
- Freitas M. S. N., Martins, M. A., Carvalho, A. J. C. (2006) Crescimento e composição mineral da menta em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada. *Horticultura Brasileira*. 24.
- Freitas, M. S. N. (2003) *Bioprodução de óleos essenciais em Mentha arvensis L em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes. Universidade Estadual do Norte Fluminense Dancy Ribeiro C.C.T. A. 57p.
- Gillis, M., Karsters, K., hoster, B., Janssens, D., etxeiras, K. R. S., Döbereiner., J., De Ley, J. (1989) *Acetobacter diazotrophicus sp nov.*, a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane *International Journal Systematic Bacteriology*. 39:361- 364.
- Ginzberg, I., David, R., Shaul, O. (1998) *Glomus intraradices* colonization regulates gene expression in tobacco roots *Symbiosis Renovot*, 25(1/3):145-157.
- Gillaspie J. R. A. G., Teakle, D. S. (1989) Ratoon Stuntig Disease. In Ricaud, C.; Egan B. T.; Gillaspie J. R. A. G.; Hughes, C. G. Disease of sugarcane, major disease *Amsterdam Elsevier* :59-80.
- Goh, T. B., Banergle, M. R. J., Burtn, D. L (1997) vesicular arbuscular Micorhizae mediated uptake and translocation of P and Zn By wheat in calcareous soil. *Canadian Journal of plant. Science*, 77:339-346.
- Grant, C. A., Flaten, D. N., Tomaslewicz, D. J., Sheppard, S. C. (2001) A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. *Informações Agrônomicas*. Piracicaba: POTAFOS, 95:1-5.

- Gupta, M. L., Prasad, A., Ram, M., Kumar, S. (2002) Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. *Bioresource Technology*, 81:77-79.
- Hardoim, P. R. (2006) *Formação de micorrizas arbusculares em análise do transcrito de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por Glomus clarum na presença de Herbicidas*. Dissertação (Mestre em Agronomia) Universidade de São Paulo Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Piracicaba. 91p.
- Harley, J. L Smith, S. E (1983) *Microrrhizal symbiosis*. London, New York: Academic press: 483p.
- Huat, O. K., Awang, K., Hashim, A. Majid, N. M. (2002) Effect of fertilizers and vesicular-arbuscular micorrizas on the growth and photosynthesis of *Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs seedlings. *Forest Ecology and Management*. 158:51-58.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. (2006) *Indicadores Conjunturais*. Rio de Janeiro. <http://www.ibge.gov.br>.
- INVAM (2000) *International Culture Collection of Vesicular and Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Species Description*. Morgantown, West Virginia Agriculture and Forestry Experimental Station. Home Page. <http://invam.caf.wvu.edu>.
- Isopi, R., Fabri, P., Delgallo, M., Puppi, G. (1995) Dual inoculation of sorghum bicolor (L) Moebch ssp. bicolor with VAM. and *A. diazotrophicus* *Symbiosis*, 18, :43-55.
- Jackson, M. L. (1965) *Soil chemical analysis*. New Jersey: Prentice Hall, 498p.
- Jaizme-Vega, M. C.; Azcón, R. (1995) Responses of some tropical and subtropical cultures to endomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, Berlin, 5:213-217.
- Junqueira, E. D. (2006) A cana-de-açúcar, origem e influência. *Jornal procana* 17 de julho. P1.
- Khan, H. G., Kueck, T. M., Chaudhry, C. S., Khoo, C. S., Hayes, W. J. (2000) Role of plants, Micorrizas and Phytochelators in heavy metal contaminated land rediation. *Chemosphere*, 41:197-207.

- Korndorfer, G. H. (1990) *Fertilizantes fosfatados sólidos e fluidos na cana-de-açúcar*. Piracicaba, Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo 91p.
- Krishna, K. R., Bagyaraj, D. J. (1981) Note on the effect of VA mycorrhiza and soluble phosphate fertilizer on sorghum. *The Indian Journal of Agricultural Sciences*, Nova Deli, 51:688-690.
- Li, C. Y., Castellano., M. A. (1987) Azospirillum isolated from within sporocarpus of micorrizal fungi liebeloma cristuliniforme, Laccaria laccata an Rhizopogon vinicolor. *Transactions of British Microbiological Society*, Cambridge, 88:563-565.
- Li, C. Y., Huang, L. L. (1987) Nitrogen-fixing (acetylene-reducing) bacterias associated With endomycorrhizal of Douglas-fir. *Plant and Soil*, Dodrecht, 98:425-429.
- Lima, E., Boddey, R. M., Döbereiner, J. (1987) Quantification of Biological Nitrogen Fixation Associated With Sugarcane using a ¹⁵ N aide Nitrogen balance. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 19:165-170.
- Malavolta, E., Vitti, G. C., Oliveira, S. A. (1997) Avaliação do estudo nutricional das plantas. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS 319P.
- Manske, G. G. B., Lüttger, A. B., Behl, R. K., Vlek, P. L. G. (1995). Nutrient efficiency Based o VA Mycorrhizae and total root length of wheat cultivars grown in *India*. *Angewandte Botanic*. 69:108.
- Marques, J. R. B., Zandonadi, D. B., Olivares, F. L., Façanha, A. R. , Canellas, L. P. (2003) Aplicação em conjunto de ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas em toletes de cana-de-açúcar. In: V Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, 2003, Curitiba. *Anais do V Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas*, 2003:117
- Marschner, H. (1995) *Mineral Nutrition of higher plants*. 2 ed, San Diego: Academic Press, 889p.
- Marschner. H., Dell. B. (1994). Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*, 159:89-102.

- Matsuoka, S. (2000) *Relatório anual do programa de melhoramento genético de cana-de-açúcar*. Araras: UFSCar, CCA, DBV. 39p.
- Moreira, F. M. S., Siqueira, J. O. (2002) *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Lavras_MG: UFLA. 626p.
- Morton, J. B., Benny, G. L. (1990) 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, 37:471-491.
- Muñoz Rojas, J., Caballero Mellado, J. (2003) Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microbial Ecology*, 46:454-464.
- Nóbrega, R. S. A., Motta J. S., Lacerda, A. M., Moreira, F. M. S. (2001) Tolerância de Bactérias Diazotróficas simbióticas à salinidade *in vitro*. *Ciências. agroecológicas*. Lavras, 28(4):899-905.
- Nogueira, M. A. (1997) *Colonização radicular e produção de micélio externo por duas espécies de fungos micorrízicos arbusculares em soja submetida a doses de fósforo*. (Teses de mestrado) Escola Superior Agrícola Luiz de Queiroz. Piracicaba, SP, 92p.
- Olivares, F. L., Baldani, J. I., James, E. K., Dobereiner, J. (1997) Infection of mottled stripe disease and resistant sugar varieties by endophytic diazotrophic *Herbaspirillum*. *New Phytologist*, 135:723-737.
- Olivares, F. L., Baldani, V. L. D., Reis, V. M., Baldani, J. I., Döbereiner, J. (1996) Occurrence of endophytic diazotrophic *Herbaspirillum* spp. In roots stems and leaves predominantly of gramineae. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, 21(3):197-200.
- Olivares, F. L., Canellas, L. P. (2006) Novas abordagens e perspectivas para maximização da promoção do crescimento vegetal por bactérias endofíticas. In: *Fertbio 2006*, Bonito-MS. Documentos / Embrapa Agropecuária Oeste, 82.. Dourados : Embrapa Agropecuária Oeste, 01:1-10.
- Oliveira, A. L. M., Boa Sorte, P. M. F., Canuto, E. L. C., Kennedy, C., Boddey, M., Reis, V. M., Baldani, J. I. (2005) Inoculação de estirpes selvagens e mutante

nif⁻ de gluconacetobacter diazotrophicus em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, 1-8.

- Oliveira, A. L. M., Urquiaga, S., Döbereiner, J., Baldani, J. (2000) biological nitrogen fixation (BNF) in micropropagate sugarcane plants inoculated with different endophytic diazotrophic bacteria. *In Nitrogen fixation: From molecules to crop productivity*. Vol. 38. *Currents Plants Science and Biotechnology in Agriculture*(eds FO Pedrosa, M Hungria, M. G Yates, WE Newton), 425p.
- Oliveira, A. L. M., Canuto, E. L., Reis, V. M., Baldani, J. I. (2003a) Response of micro propagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 34 (1):59-61.
- Oliveira, A. L. M.; Urquiaga, S.;dobereiner, J.; Baldani, J. I. (2003) The effect of inoculating endophytic N₂ -fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*, 242:205-215.
- Orlando Filho, J. (1980). Crescimento e absorção de nutrientes pela cana-de-açúcar variedade CB 41-76. Em função da idade em solos do Estado de São Paulo. Piracicaba, Panalsucar, 128p. (*Boletim Técnico*. 2).
- Orlando Filho, J. (1983). *Nutrição e adubação da cana-de-açúcar no Brasil*. Rio de Janeiro: IAA/PANALSUCAR, 368p. (coleção Planalsucar, 2)
- Orlando Filho, J., Zambelo Júnior, E. (1980) Influência da adubação NPK nas qualidades tecnológicas da cana-planta, variedade CB 41-76. *Brasil Açucareiro*, 96(3):37-44.
- Pacovsky, R. S. (1989) metabolic differences in Zea-Glomus-azospirillum symbiosis. *Soil Biology and Biochemistry*, 21:953-960.
- Paula, M. A., Reis, V. M., Döbereiner, J. (1991) Interaction of Glomus clarum with Diazotrophicus in infection of sweet potato, sugarcane, sweet shorgum,. *Biology and Fertility of Soil*, 11:111-115.
- Paula, M. A., Urquaiia. S., Siqueiras, J. O., Döbereiner, J. (1992) Synergitic effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic Bacterias on nutrition and grown of sweet potato. *Biology and fertility of soils*, 14:61-66.

- Paula, M. A., Siqueira, J. O., Döbereiner, J. (1993) Ocorrência de fungos micorrízicos vesículoarbusculares e bactérias diazotróficas na cultura de batata-doce. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, Campinas, 17:349-356.
- Pereira E. G., Siqueira, J.O. , Curio, N., Moreira, F. M. S., Purcino, A. A. C. 1996 Efeitos da micorriza e do suprimento de fósforo na atividade enzimática e na resposta de espécies arbóreas ao nitrogênio. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 8(1):59-65.
- Pereira, J. R., Farias, C. M. B., Morgado, L. B. (1995) Efeito de níveis e do resíduo de fósforo sobre a produtividade de cana-de-açúcar em vertissolo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 30(1)43-48.
- Pfeffer, P. E., Douds Júnior. D. D., Bécard, G., Shachar-Hill Y. (1999). Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology*, 120:587-598.
- Pimentel, J. P., Olivares, F. L., Pitard, R. M., Urquiaga, S. C., Akiba, F., Döbereiner, J. (1991) Dinitrogen fixation and infection of grasses leaves by *pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant and soil*, Dordrecht, 137(1)61-65.
- Pralon, A. Z., Martins, M. A. (2001). Utilização do resíduo industrial Ferkal na produção de mudas de Mimosa *caesalpiniaefolia Benth*, em estéril de extração de argila, inoculadas com fungos micorrízicos arbuscular e rizóbio.. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 25(01):55-63.
- Polidoro, J. C., Resende, A. S., Quesada, D. M., Xavier, R. P., Coelho, C. H. M., Alves, B. J. R., Boddey, R. M., Urquiaga S. (2001) Levantamento da contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura da cana-de-açúcar no Brasil, *Documento Nº 144. ISSN1517-8498. Seropedicae Rj. Dizembro*.
- Raghothama, K. G. (1999) phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and plant molecular biology*, 50(5):665-696.
- Raij B Van., Andrade J. C., Cantarella, H., Furlani A. M. C. (ed.) (1997) Cana-de-açúcar. In: *Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo*. 2. ed Campinas: Instituto Agrônomo – Fundação IAC. 237-239. (Boletim Técnico, 100).

- Raij, B. (1991) van. Fertilidade do solos e adubação. São Paulo. Piracicaba: Ceres, *Potafos*. 343p.
- Reis, V. M., Paula, M. A., Döbereiner J. (1999) Ocorrência de Micorrizas Arbusculares e da Bactéria Diazotrófica *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, 34(10):1933-1941.
- Reis, V. M., Olivares, F. L., de Oliveira, A. L. M., Reis, J. R. F. B., Baldani, J. I., Döbereiner, J. (1999 a) Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants were *Acetobacter diazotrophicus*. *Plants end Soil*. 206:205-211.
- Reis, V. M., Olivares, F. L., Jaimes, E. K., Baldani, J. I., Döbereiner, J. (1993) Infection of sugar cane by nitrogen-fixing bacteria. In: Palacios, R., Mora, J., Newton, W.E. eds. *New horizons in nitrogen fixation*. Kluwer Academic Publishers, 705p.
- Ricaud, C., Ryan, C. C., Leaf Scald. In Ricaud, C., Egan. B. T., Gillaspie. J. R., Hughes, C. G. (1989) (Ed), *Diseases of sugarcane*; major Diseases. Amsterdam: *Elsiever science*, 39-58.
- Saggin, J. O. J., Siqueira, J. O. (1996) Micorrizas arbusculares em cafeeiro. In: Avanços em Fundamentos e Aplicação de Micorrizas. Ed. José Oswaldo Siqueira. *Labras*, M.G, 19(2):221-228.
- Salas, R. V. M. (2002) *Atividade microbiana do solo e interação de diazotróficos endofíticos e fungos micorrízicas arbusculares na cultura de trigo*, teses (Máster Agronomia) piracicaba. USP 137p.
- Salas, R. V. M., Freitas, V. V., Donzeli, V. P., Freitas, J. G., Gallo, P. V., Silveira, A. P. D. (2005) Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo, *Rev. Bras. Ciências Solo* Viçosa, 29.
- Samarão, S. S. (1998) *influência dos fungos arbusculares na produção de mudas de banana (Musa spp) e mudas de goiabeira (Psidium guajava L)* Teses (Mestrado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes-Rj, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 60p.
- Sampaio, E. U. S. B., Salcedo, T. H., Bettany, J. (1984) Dinâmica de nutrientes em cana-de-açúcar. I eficiência na utilização de uréia (¹⁵N) em ampliação ou parcelada. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 19:943-949.

- Schachtman, D. P., Reid, R. J., Aling, S. M. (1998) Phosphorus Uptake by plants physiology, 116:447-453.
- Schiavo, J. A., Martins, M. A. (2002) Produção de mudas de goiabeira (*Psidium guajava* L.), inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum*, em substrato agro-industrial. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 24(2):519-523.
- Siqueira, J. O. (1994) Micorrizas arbusculares. In Araújo, R.S. e Hungria. M., eds. *Microrganismos de importância agrícola*. Brasília, DF, EMBRAPA, 151-194.
- Siqueira, J. O., Lambais, M. R., Stürmer, S. L. (2002) Fungos micorrízicos arbusculares: características, simbiose e aplicação na agricultura. *Biociência* 12(1):12-21
- Siqueira J. O.; Franco, A. A. (1988) *Biociência* do Solo: Fundamentos e perspectivas. Brasília: MEC/ABEAS/Lavras: ESAL/FAEPE, 236p.
- Siqueira, J., Pouyú, E.; Moreira F. M. S. (1999) Micorrizas arbusculares no crescimento pós-transplante de mudas de árvores em solos com excesso de metais pesados *Revista Brasileira de Ciências de Solos*, Campinas, 23(5):569-580.
- Silva, G. M.de A. (1983) Influência da adubação na cana-de-açúcar. In Orlando Filho, J. Nutrição e adubação da cana-de-açúcar no Brasil. Piracicaba: IAA, PLANALSUCAR< cap.4, 317-332.
- Silva, L. G., Miguens, F. C , Olivares, F. L. (2006) Diferenças Ultraestruturais na Interação de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* com plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum* hyb.). In: Fertbio 2006, Bonito-MS. CD-ROM, Anais, Documentos 82/ Embrapa Agropecuária Oeste. Dourados - MS : Embrapa Agropecuária Oeste, 01. 01-04.
- Silveira, A. P. D. Micorrizas. IN: Cardoso, E. J. P. N.; Neves, M. C. P. (1992) (Ed). *Microbiologia de solo*. Campinas-SP; sociedade *Brasileira de ciência do solo*, Cap. 19:257-282.
- Smith, G. S., Gianinazzi-Pearson, (1988) Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Stanford, 32(1):393-409.
- Smith, S. E., Read, D. J (1997) *Mycorrhizal symbiosis*. 2. ed. San Diego, Academic Press, 605p.

- Stephan, M. P., Oliveira, M., Teixeira K. R. R., Martinez-Drets, G., Dobereiner (1991) Physiology and Dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. F.E.M.S. Microbiol Lett. 67-72.
- Suárez H. J., Gómez, J. I., Francia S. S. (2003) Programa de Fito-mejoramiento e Impacto en la producción Azucarera Cubana *Creaciones Graficas. PUBLINICA*. 99p.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2004) Fisiologia Vegetal.3^a ed. Trad. Eleane Romanato Satarem et al Porto Alegre . Artmed. 719p.
- Takahashi, D (2005) *Análises de seqüências expressas em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por Glomus clarum*. Teses (Doutor em Agronomia)- Piracicaba. Univesidade de São Paulo - U.S.P, 118p.
- Urquiaga, S., Cruz, K. H. S., Boddey, R. M (1992) Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil science society of America proceeding*, Madison, 56:105-114.
- Yamada Y., Hoshino K., Ishikawa T. (1987) Gluconazotobacter. Combinations previously Effectively published Outside the IJSB, List no. 64 *International Journal Systematic Bacteriology*. 48:327-328.
- Varma, A. K., Singh, K., Lall, K. (1981) Lumen bacteria from endomycorrhizal spores. *Current Microbiology*, 6:207-211.
- Vazquez, M. M., Barea, J. M. (2000) Impact of soil nitrogen concentration on *Glomus Spp*-Sinorhizobium interactions as affecting growth nitrate reductase Activity and protein content of *Medic ago sativa*. *Biology and Fertility of soil*, 34:57-63.

APÊNDICE

Faixa de teores de macronutrientes nas condições de desenvolvimento do experimento.

Tabela 1A: Faixa de teores de macronutrientes das Médias mínimas e máximas

	Médias mínimas e máximas				
	N	P	K	Ca	Mg
Faixa de macronutriente no experimento (g kg^{-1})	5,6-6,1	1,0-4,3	10-16,6	2,5-3,0	1,7-2,3
Faixa adequada segundo (Raij et al., 1997)	18-25	1,5-3,0	10-16	2,0-8,0	1,0-3,0

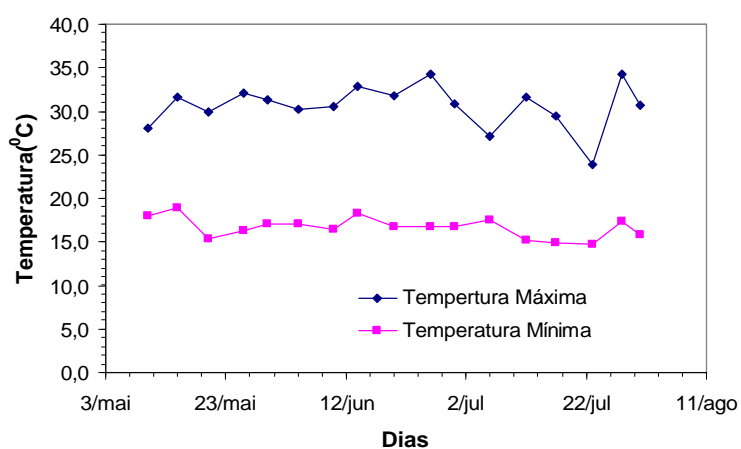


Figura 2A. Temperatura máxima e mínima diária.

Quadro B Resumo da análise da variância para a variável: matéria seca raiz (MSR) da parte aérea (MAS) da matéria seca total (MST) e porcentagem de colonização (% Col).

Fonte de variação	GL	Quadrados médios			
		MSA	MSR	MST.	% Col.
Bloco	2	151,15 S	18,841 ns	200,300 S	445,679 ns
Fungo	2	5,000 ns	4,860 ns	9,573 ns	36897,53 S
Bactéria	2	1,440 ns	9,696 ns	10,910 ns	38,2716 ns
Fósforo	2	194,976 S	65,221 S	436,290 S	3275,308 S
F x B	4	2,618 ns	12,155 ns	20,519 ns	66,0493
F x P	4	4,663 ns	6,756 ns	14,628 ns	1130,864 ns
B x P	4	26,969 S	34,655 S	104,372 S	138,271 ns
F x B x P	8	6,392 ns	4,328 ns	7,105 ns	102,160 ns
Resíduo	52	10,603	11,9	33,158 ns	214,909
Coeficiente de Variação		11,515	25,9	13,9	34,22

S - significativo ao nível de 5% teste Tukey

Ns – não significativo ao nível de 5% teste Tukey

Quadro A Resumo da análise da variância para as variáveis: nitrogênio (N), fósforo (P) potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg).

Fonte de variação	GL	Quadrados médios				
		N	P	K	Ca	Mg
Bloco	2	1583,39 S	501,360 S	11133,7 ns	358,842 ns	213,065 ns
Fungo	2	742,198 S	79,1090 ns	10313,8 ns	1045,27 S	436,735 S
Bactéria	2	113,485 ns	8,12812 ns	990,620 ns	123,550 ns	77,8221 ns
Fósforo	2	5654,94 S	75653,76 S	143729,0 S	207,918 ns	7352,10 S
F x B	4	146,858 ns	100,078 ns	6799,85 ns	111,882 ns	525,669 S
F x P	4	102,776 ns	77,5042 ns	13075,9 ns	426,135 S	283,591 ns
B x P	4	324,378 ns	102,820 ns	10381,1 ns	752,055 S	257,383 ns
F x B x P	8	411,269 ns	96,2686 ns	7588,42 ns	368,912 S	261,553 ns
Resíduo	52	227,522	150,962 ns	8335,67	131,657	135,011
Coeficiente de Variação		10,167	18,933	22,749	15,817	20,233

S - significativo ao nível de 5% teste Tukey

Ns – não significativo ao nível de 5% teste Tukey