

ESMERALDA APARECIDA PORTO LOPES

**INTERAÇÃO BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM
PLANTAS E *Glomus clarum* NA MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)
MICROPROPAGADA**

**RECIFE-PE
2015**

ESMERALDA APARECIDA PORTO LOPES

**INTERAÇÃO BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM
PLANTAS E *Glomus clarum* NA MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)
MICROPROPAGADA**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências do Solo.

Orientadora: Márcia do Vale Barreto Figueiredo, D.Sc.
Co-orientador: Antônio Dias Santiago, D.Sc.

**RECIFE-PE
2015**

Tese ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor Ciências do Solo.

Tese aprovada em 24/02/2015

Esmeralda Aparecida Porto Lopes

Márcia do Vale Barreto Figueiredo, D.Sc.
Orientadora
Instituto Agronômico de Pernambuco-IPA/SEAGRI

Banca examinadora

Antônio Dias Santiago, D.Sc.
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA
Tabuleiros Costeiros

Janete Magali de Araújo, D.Sc.
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE/Departamento de
Antibióticos

Giselle Gomes Monteiro Fracetto, D.Sc.
Universidade Federal Rural de Pernambuco-
UFRPE/Departamento de Agronomia

Adália Cavalcanti do Espírito Santo Mergulhão, D.Sc.
Instituto Agronômico de Pernambuco-IPA

Aos meus pais

Eloisio (in memoriam) e Maria Aparecida por serem meus exemplos de vontade, seriedade e dedicação e a quem continuamente empenho minha honra.
Dedico

Aos meus irmãos

Eloisio Júnior, Isabel, Carlos, Magdala e Magda companheiros eternos em todas as fases de minha vida.
Dedico

Ao meu companheiro

Hildebrando Crisóstomo por todo amor, carinho, dedicação, por sempre acreditar em mim e nunca medir esforços para que esse sonho um dia se concretizasse.
Dedico

Aos tesouros de minha vida

*Maria Clara, Pedro Iam e Matheus Marroquim
Que compartilharam as agruras da empreitada, a certeza de que, havendo conquista, esta também a eles pertence.*
Ofereço

“Mude as suas opiniões, mantenha os seus princípios,
troque suas folhas e mantenha suas raízes”.

Vitor Hugo.

“O correr da vida, embrulha tudo. A vida é assim: esquenta
e esfria, aperta e aí frouxa, sossega e depois desinquieta. O que
ela quer da gente é coragem”.

Guimarães Rosa.

Agradecimentos

A Deus, sem ELE nada seria possível.

À UNEAL (Universidade Estadual de Alagoas), pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

À UFRPE (Universidade Federal Rural de Pernambuco) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências do Solo pela oportunidade de desfrutar dos conhecimentos gerados.

Ao IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco), pelo suporte laboratorial e de campo de extrema valia à execução da tese.

À Dra. Márcia do Vale Barreto Figueiredo pela orientação e por ser fiel companheira, brava disciplinadora e um exemplo de vida.

Ao Dr. Antônio Dias Santiago (EMBRAPA/Tabuleiros Costeiros) pela co-orientação e colaboração no presente trabalho.

Ao Dr. José de Paula Oliveira (IPA) pelo apoio, sugestões, incentivo, convívio e amizade.

Ao Dr. Almir Dias Alves da Silva (IPA) pelo conhecimento transmitido sobre a cultura da mandioca e auxílio no planejamento e condução deste trabalho.

Ao Dr. Antônio da Silva Souza do CNPMF/EMBRAPA, pelos ensinamentos necessários imprescindíveis à elaboração deste trabalho.

Às Dras. Carolina Etienne, Claudia Elizabete Pereira Lima, Janete Magali de Araújo, Júlia Kuklinsky, Maria Betânia Galvão e Dr. Mario Lira Júnior pela amizade e colaboração no presente trabalho.

Às Dras. Adália Cavalcanti do Espírito Santo Mergulhão, Deise Maria Passos da Silva, Tereza Cristina de Assis e ao Dr. Rodrigo Leandro Braga pela colaboração na condução deste trabalho.

Ao Dr. Fritz Oehl Research Institute Agroscope Reckenholz/Zürich pela contribuição na identificação dos gêneros de FMA contidos neste trabalho.

Ao Professor Cosme Rafael Martínez do Departamento de química /UFPB pela colaboração e sugestões neste trabalho.

Aos Doutores Fábio André Brayner e Luiz Carlos Alves do Laboratório de Biologia Celular e Molecular - AGGEU/Fundação Oswaldo Cruz pela colaboração e paciência.

Ao Dr. Venézio Felipe dos Santos pela ajuda prestada na estatística deste trabalho.

Aos amigos Aníbia Vicente e Jadson Emanuel pela bela amizade que construímos.

Aos amigos de turma: Camila, Diego, Elaine, Flávio, Gerson, Igor, Janyelle, Monaliza, Maykon, Remy, Ygor, Yuri, por compartilharem momentos importantes da minha caminhada.

À equipe do Laboratório de Biologia do Solo do IPA: Arthur Lira, Aline Mesquita, Carolina Kropniczk, Carolina Figueirôa, Carminha, Emmanuella Vila Nova, Fernando (Nandinho), Josemi Ferreira (Júnior), Marília Malta, Marta Amâncio, Maria Vanilda, Marilene, Rogério Portela, Rosa Moraes e Sr. Mário pelas fundamentais e indispensáveis contribuições para a realização dos trabalhos.

À equipe do Laboratório de Cultura de Tecido do IPA: Janaína, Eduardo, Catarina Fernanda, Samantha, Pablo e Juliana.

À equipe do Laboratório de Análise de Planta, Ração e Água (LAPRA) do IPA Marilene Pimentel e Sandra Mendes pela colaboração nas análises de N.

À equipe do Laboratório de Forragicultura/UFRPE, em nome da Dra Mércia e dos Drs Alexandre e Francisco pela colaboração no processamento das amostras.

À professora e amiga Elizabeth Pereira da Silva pelas inúmeras correções ortográficas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro para a realização de parte das atividades experimentais. A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse sonho.

Sumário

Lista de tabelas	x
Lista de figuras	xii
Lista de anexo	xiv
RESUMO GERAL.....	xv
GENERAL ABSTRACT.....	xvii
1. Introdução geral	19
2. Fundamentação teórica.....	21
2.1 A cultura do mandioca	21
2.2 Panorama da cultura no Brasil.....	23
2.3 Micropropagação da mandioca.....	25
2.4 Bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs).....	26
2.5 Fungos micorrízicos arbusculares (FMA).....	29
3. Referências bibliográficas.....	32
Capítulo I.....	42
Acclimatization of inoculated seedlings of <i>Manihot esculenta</i> Crantz <i>in vitro</i> with plant growth-promoting bacteria.....	42
ABSTRACT	43
1. Introduction.....	44
2. Material and Methods	44
2.1 Multiplication and preparation of inoculants	45
2.2 Selection and disinfection of stem cuttings	45
2.3 Isolation of shoots, establishment of apexes and multiplication of cassava plants.....	45
2.4 PGPB inoculation	46
2.5 Acclimatization.....	46
2.6 Statistical analysis	47
3. Results and Discussion.....	47
3.1 Cassava micropropagated plant survival to bacterial colonization	47
3.2 PGPB inoculation and development of cassava seedlings	48
4. Conclusions.....	53
5. Acknowledgements	54
6. References	54
Capítulo II.....	63
Co-inoculation of growth promoting bacteria in plants and <i>Glomus clarum</i> in micropropagated <i>Manihot esculenta</i> Crantz.	63
SUMMARY	65
Introduction.....	65
Material and Methods	68
Multiplication and preparation of bacterial inoculants.....	68

Multiplication of <i>Glomus clarum</i>	68
Selection and disinfection of cuttings	69
Isolation of shoots, establishment of stem apexes and multiplication of cassava plants.....	69
Inoculation of PGPBs and acclimatization	70
Transplant to pots.....	70
Statistical analysis	71
Results	72
Discussion	75
Conclusions	81
References	81
Capítulo III.....	96
Interrelação BPCP e <i>Glomus clarum</i> em mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) micropropagadas no Espodossolo.....	96
1. Introdução	99
2. Material e Métodos	100
2.1 Área de estudo	100
2.2 Delineamento experimental e tratamentos.....	101
2.3 Multiplicação e preparação dos inoculantes bacterianos e fúngico	102
2.4 Inoculação da BPCPs nas plântulas de mandioca.....	102
2.5 Aclimatização	103
2.6 Instalação e condução do experimento	104
2.7 Análise estatística.....	105
3. Resultados	105
3.1 Colonização micorrízica, número de glomerosporos e gêneros de FMA autóctones.....	105
3.2 Avaliação da promoção de crescimento vegetal	106
3.3 Nitrogênio e fósforo acumulado na matéria seca parte aérea e na raiz e porcentagem de proteína bruta na parte aérea.....	107
4. Discussão.....	107
4.1 Colonização micorrízica, número de glomerosporos e gêneros de FMA autóctones.....	107
4.2 Avaliação da promoção de crescimento vegetal	109
4.3 Nitrogênio e fósforo acumulados na matéria seca parte aérea e na raiz e porcentagem de proteína bruta na parte aérea.....	111
5. Conclusões.....	113
6. Agradecimentos	113
Referências	113
ANEXO	127

Lista de tabelas

Capítulo I

- Table 1** Stem diameter (DS), seedling height (SH) and root length (LR) of cassava plantlets (*Manihot esculenta* Crantz) cv. "BRS Poti Branca" and "BRA Pretinha III" assessed for inoculation PGPBs..... 61
- Table 2** Shoot dry matter (SDM), root dry matter (RDM), SDM/RDM ratio and nitrogen accumulated in the shoot dry matter of ($N_{ac}SDM$) of cassava plantlets (*Manihot esculenta* Crantz) cv. "BRS Poti Branca e BRA Pretinha III" assessed for inoculation with PGPBs..... 62

Capítulo II

- Table 1** Mycorrhizal colonization and number of glomerospores of micropropagated plants of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cv. (BRA Pretinha III) evaluated at 100 days after planting in relation to inoculation with PGPBs and *G. clarum*..... 88
- Table 2** Stem diameter of micropropagated plants of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cv. (BRA Pretinha III) evaluated in times 49, 65, 84 and 100 days after planting (DAP) in relation to inoculation of PGPBs and *G. clarum* in greenhouse..... 89
- Table 3** Height of micropropagated cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) cv. (BRA Pretinha III) evaluated at times 49, 65, 84 and 100 days after planting (DAP) in relation to inoculation of PGPBs and *G. clarum* in greenhouse..... 90
- Table 4** Root dry matter (RDM), shoot dry matter (SDM) and shoot dry matter/root dry matter (SDM/MSR) ratio of micropropagated cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) cv. (BRA Pretinha III) evaluated at 100 days after planting in relation to inoculation of PGPBs and *G. clarum*..... 91
- Table 5** Nitrogen accumulated in the shoot dry matter ($N_{ac}SDM$) and nitrogen accumulated in root dry matter ($N_{ac}RDM$) and crude protein and accumulated phosphorus content in dry matter of shoots (PSDM) of micropropagated cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) cv. (BRA Pretinha III) evaluated at 100 days after planting in relation to inoculation of PGPBs and *G. clarum*..... 92

Capítulo III

Tabela 1	Colonização micorrízica e número de glomerosporos de plantas micropropagadas de mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) cv. “BRA Pretinha III” avaliadas aos 203 dias após o plantio em relação à inoculação de BPCPs e <i>Glomus clarum</i>	120
Tabela 2	Taxa de sobrevivência, diâmetro do caule e altura de plantas micropropagadas de mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) cv. “BRA Pretinha III” inoculadas com BPCPs e <i>Glomus clarum</i> aos 203 dias após o plantio em um solo Espodosolo Cárbico Órtico.....	121
Tabela 3	Índice de colheita (IC), rendimento matéria seca parte aérea (RMSPA), rendimento matéria seca raiz (RMSR) e teor de amido (Tamido) de plantas micropropagadas de mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) cv. (BRA Pretinha III) inoculadas com BPCPs e <i>Glomus clarum</i> aos 203 dias após o plantio em um Espodosolo Cárbico Órtico.....	122
Tabela 4	Nitrogênio acumulado na matéria seca da parte aérea ($N_{ac}MSPA$), proteína bruta (PB), nitrogênio acumulado na matéria seca raiz ($N_{ac}MSR$), teor de fósforo na matéria seca parte aérea (PMSPA), teor de fósforo na matéria seca raiz (PMSR) em plantas micropropagadas de mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) cv. (BRA Pretinha III) inoculadas com BPCPs e <i>Glomus clarum</i> aos 203 dias após o plantio em um Espodosolo Cárbico Órtico.....	123

Lista de figuras

Capítulo I

- Figure 1** Images of the root fragments of cassava seedlings of "BRA Pretinha III" cultivar inoculated with (A) control treatment (CT); (B) *Paenibacillus brasiliensis* (24); (C) *Paenibacillus durus* (V 2232); (D) *Paenibacillus graminis* (MC 0421); (E) *Azospirillum amazonense* (BR 11140); (F) *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175); (G) *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284); and (H) *Streptomyces* sp. (S 30) obtained by scanning electron microscopy..... 58
- Figure 2** Images of the root fragments of cassava seedlings of "BRA Poti Branca" cultivar inoculated with (A) control treatment (CT); (B) *Paenibacillus brasiliensis* (24); (C) *Paenibacillus durus* (V 2232); (D) *Paenibacillus graminis* (MC 0421); (E) *Azospirillum amazonense* (BR 11140); (F) *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175); (G) *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284); and (H) *Streptomyces* sp. (S 30) obtained by scanning electron microscopy..... 59
- Figure 3** Survival rate of cassava seedlings *Manihot esculenta* Crantz. cv. ("BRS Poti Branca" and "BRA Pretinha III") inoculated with PGPB *Azospirillum amazonense* (BR 11140); *Paenibacillus graminis* (MC 0421); *Paenibacillus durus* (V 2232); *Paenibacillus brasiliensis* (24); *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175); *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284); *Streptomyces* sp (S 30); and control treatment (CT) at 42 days after planting (DAP)..... 60

Capítulo II

- Figure 1** Root length of micropropagated plants of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cv. (BRA Pretinha III) evaluated at 100 days after planting in relation to inoculation of PGPBs and *Glomus clarum* in the greenhouse. Equal lowercase letters between treatments (PGPBs) and equal capital letters between presence and absence of AMF do not differ by Tukey test ($P < 0.05$). *Azospirillum amazonense* (BR 11140), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284), *Streptomyces* sp (S 30), nitrogen control (CN), and absolute control (CT). Average of 3 repetitions. %CV = 24.96..... 93
- Figure 2** Stem diameter of micropropagated plants of cassava depending on the presence or absence of *G. clarum* at 49, 94

65, 84 and 100 days after planting in the greenhouse.....

- Figure 3** Height of micropropagated plants of cassava depending on the presence or absence of *Glomus clarum* at 49, 65, 84 and 100 days after in greenhouse..... 95

Capítulo III

- Figura 1** Precipitações mensais ocorridas durante o experimento Interrelação BPCP e *Glomus clarum* em *Manihot esculenta* Crantz no Espodossolo. Fonte: Estação meterológica de Itapirema-IPA/Goiana/PE..... 124

- Figura 2** Fotomicrografia dos esporos de FMA presentes na área de estudo (Estação Experimental de Itapirema- IPA) aos 200 DAP de plantas micropropagadas de mandioca (cv. BRA Pretinha III). (A) e (B) *Acaulospora* sp, (C) *Scutellospora* sp, (D) *Glomus* sp, (E) *Fuscutata* sp, (F) *Gigaspora* sp. Aumento de 40x..... 125

Lista de anexos

Anexo 1	Comprovante de envio do papper para Journal of Microbiology.....	127
Anexo 2	Comprovante de envio do papper para Journal of Agricultural Science.....	128
Anexo 3	Multiplicação do <i>Glomus clarum</i> usando como planta hospedeira o painço (<i>Panicum miliaceum</i> L.).....	129
Anexo 4	Plantio das manivas (a), extração dos brotos (b), estabelecimento dos meristemas (c), multiplicação (d).....	129
Anexo 5	Corte das raízes (a) e inoculação das BPCPs (b).....	130
Anexo 6	Lavagem das raízes (a), inoculação do solo-inóculo (b), cobertura com copo descartável (c), retirada do copo descartável (d) aos 20 DAP.....	130
Anexo 7	Adubação de acordo com a análise química do solo (a), transplante para os vasos de 8 kg de solo Espodossolo (b) e vista geral do experimento Co-inoculação bactérias promotoras de crescimento em plantas e <i>Glomus clarum</i> em <i>Manihot esculenta</i> Crantz micropropagada c) os 66 DAP.....	131
Anexo 8	Modelo da parcela experimental representando o consórcio entre a mandioca e mucuna-preta no experimento Interrelação BPCP e <i>Glomus clarum</i> em <i>Manihot esculenta</i> Crantz no Espodossolo.....	131
Anexo 9	Plantio das mudas (a e b), inoculação sementes de mucuna- preta (c), mistura (d), aplicação de solução açucarada (e), plantio das sementes (f).....	132
Anexo 10	Acondicionamento dos inoculantes (a) e reinoculação das estirpes bacterianas (b) no experimento Interrelação BPCP e <i>Glomus clarum</i> em <i>Manihot esculenta</i> Crantz no Espodossolo.....	133
Anexo 11	Vista geral do experimento Interrelação BPCP e <i>Glomus clarum</i> em <i>Manihot esculenta</i> Crantz no Espodossolo no dia da coleta.....	133

RESUMO GERAL

Lopes, Esmeralda Aparecida Porto; DSc. em Agronomia (Ciências do Solo); Universidade Federal Rural de Pernambuco; Fevereiro/2015. **INTERAÇÃO BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM PLANTAS E *Glomus clarum* NA MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) MICROPROPAGADA** Márcia do Vale Barreto Figueiredo (Orientadora) e Antônio Dias Santiago (co-orientador).

Lopes, Esmeralda Aparecida Porto; DSc. em Agronomia (Ciências do Solo); Universidade Federal Rural de Pernambuco; Fevereiro/2015. **INTERAÇÃO BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM PLANTAS E *Glomus clarum* NA MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) MICROPROPAGADA** Márcia do Vale Barreto Figueiredo (Orientadora) e Antônio Dias Santiago (co-orientador).

Uma das tecnologias alternativas para melhorar o desenvolvimento de plantas é a inoculação de micro-organismos benéficos que, isolados ou combinados, exercem funções importantes para a sobrevivência, crescimento e desenvolvimento vegetal. Nesse contexto, é estratégico e prioritário realizar trabalhos para avaliar a interrelação bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs) e fungo micorrízico arbuscular (FMA) visando obter combinações de micro-organismos que favoreçam o aumento da produtividade da mandioca, visando uma agricultura sustentável. Foram instalados dois experimentos em casa de vegetação na sede do Instituto Agrônomo de Pernambuco-IPA e um em campo, na estação experimental de Itapirema (IPA), município de Goiana/PE. Os cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) estudados foram “BRA Pretinha III” e “BRS Poti Branca”. As BPCPs utilizadas foram *Azospirillum amazonense* (BR 11140), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175), *Paenibacillus brasiliensis* (24), *Paenibacillus graminis* (MC 0421), *Paenibacillus durus* (V 2232), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284), *Streptomyces* (S 30) e o FMA utilizado foi o *Glomus clarum*. No experimento I foi avaliado o efeito da inoculação com BPCPs no processo de aclimatização de plântulas de mandioca micropropagadas. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, no esquema fatorial 8 x 2 (7 estirpes + 1 testemunha absoluta e 2 cultivares de mandioca), com 3 repetições. Foram utilizados como unidade experimental copos descartáveis com capacidade de 500 mL, preenchidos com 340 g de uma mistura de solo+substrato (1:1). No experimento II foi avaliado o efeito sinérgico da interação *Glomus clarum* e BPCPs em plântulas micropropagadas de mandioca cv. “BRA Pretinha III”. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, no esquema fatorial 12 x 2 (inoculação de 4 estirpes individuais e 6 em mistura + 2 testemunhas (absoluta- TA e nitrogenada - TN) com e sem FMA, com 3 repetições. Foram utilizados, como unidade experimental, vasos preenchidos com 8 kg de solo (Espodossolo Cárbico Órtico) esterilizado. O experimento III foi conduzido em campo e foi avaliada a Interrelação BPCP e FMA em plantas micropropagadas de mandioca do cv. “BRA Pretinha III”. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com 10 tratamentos (3 estirpes bacterianas individuais e 4 em mistura + 3 testemunhas (TA + FMA, TN + FMA e TA sem FMA), com 4

repetições. As variáveis analisadas nos experimentos foram: colonização bacteriana, taxa de sobrevivência, altura da planta, comprimento da raiz, diâmetro do caule, matéria seca da parte aérea e raiz, índice de colheita, rendimentos da massa seca da parte aérea e raiz, relação matéria seca da parte aérea/matéria seca raiz, número de glomerosporos, colonização micorrízica, nitrogênio acumulado, teor de P, % de proteína bruta e teor de amido. Constatou-se que a análise da microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou uma colonização satisfatória nas raízes das plantas inoculadas, com exceção das plantas inoculadas com as bactérias do gênero *Paenibacillus*. As estirpes utilizadas, mesmo não sendo homólogas, otimizaram os cultivares “BRA Pretinha III e BRS Poti Branca” em condições assépticas, o que pode conferir maior tolerância aos estresses abióticos promovidos pela transferência da planta de um meio *in vitro* para *ex vitro*. As BPCPs proporcionaram melhor performance ao cultivar “BRA Pretinha III” em relação ao “cultivar BRS Poti Branca” na mandioca. Em casa de vegetação as estirpes de BPCPs inoculadas na mandioca cv. “BRA Pretinha III” influenciaram a colonização micorrízica e o número de glomerosporos, assim como ocorreu efeitos sinérgicos do *Glomus clarum* com as BPCPs. O teor de proteína bruta revelou a contribuição das BPCPs na nutrição nitrogenada da mandioca onde as plantas inoculadas assimilaram N na proporção equivalente com as que receberam N mineral. A inoculação conjunta BPCPs e *Glomus clarum* promoveu um melhor desempenho no crescimento das plantas demonstrando micotrofismo obrigatório. A co-inoculação BPCPs e FMA pode suprir a necessidade de N para a mandioca, inferindo redução no uso de fertilizante nitrogenado. Em campo as estirpes de BPCPs inoculadas na mandioca cv. “BRA Pretinha III” também influenciaram a colonização micorrízica e o número de glomerosporos. As plantas micropropagadas de mandioca apresentaram uma baixa produtividade, sugerindo ser devido ao cultivo na primeira geração. Os teores de amido na mandioca foram satisfatórios para os valores requeridos pela indústria. A dose aplicada do fertilizante nitrogenado não contribuiu na otimização da mandioca cv. “BR Pretinha III” em nenhuma variável avaliada inferindo baixo custo econômico e ecológico com a aplicação dos microorganismos. Os fungos micorrízicos arbusculares identificados na área de estudo devem ser isolados e multiplicados para serem utilizados como inóculo em futuras pesquisas, assim como potencializar estudos com novas formulações de insumos biológicos, para a mandioca, visando incrementar a produtividade dessa cultura em condições de micropropagação e/ou propagação em campo.

Palavras chave: BPCP, FMA, micropropagação, produção de mudas, aclimatização, sinergismo, rendimento, Espodossolo

GENERAL ABSTRACT

Lopes, Esmeralda Aparecida Porto; PhD student in Agronomy (Soil Science); (Ciências do Solo); Universidade Federal Rural de Pernambuco; February/2015. **INTERACTION OF PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA AND *Glomus clarum* IN CASSAVA MICROPROPAGATED PLANTS (*Manihot esculenta* Crantz)** Márcia do Vale Barreto Figueiredo (Supervisor) e Antônio Dias Santiago (co-supervisor).

An alternative technology for improving plants development is the inoculation of beneficial microorganisms which, isolated or in combination, play important roles for the survival, growth and development of plants. In this context, it is strategic and a priority to undertake studies assessing the interrelation between plant growth-promoting bacteria (PGPBs) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), in order to obtain microorganisms combinations that encourage an increase in cassava productivity, aiming a sustainable agriculture. Two experiments were installed in a greenhouse at the headquarters of the Agronomic Institute of Pernambuco-IPA, and another one in the field, at the experimental station of Itapirema (IPA), in the municipality of Goiana/PE. The cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz) studied were "BRA Pretinha III" and "BRS Poti Branca." The PGPBs used were *Azospirillum Amazonense* (BR 11140), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175), *Paenibacillus brasiliensis* (24), *Paenibacillus graminis* (MC 04.21), *Paenibacillus durus* (V 2232), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284) and *Streptomyces* (S 30), and the AMF used was *Glomus clarum*. In the experiment I, the effects of inoculation with PGPBs in the process of acclimatization of micropropagated cassava seedlings was assessed. The experimental design was of randomized blocks in a factorial 8 x 2 (7 strains + 1 absolute control (TA) and 2 cassava cultivars), with 3 replications. Disposable cups with 500 mL capacity, filled with 340 g of a mixture of soil and ground substrate (1:1) were used as experimental unit. In the experiment II, the synergistic effect of *Glomus clarum* and PGPBs interaction in micropropagated seedlings of cv. "BRA Pretinha III" cassava was evaluated. The experimental design was of randomized blocks in a factorial 12 x 2 (inoculation of 4 individual strains and 6 mixed + 2 controls (TA, TN), with and without AMF), with three replications. Vases filled with 8 kg of sterilized soil (Orthic Carbic Spodosol) were used as experimental unit. The experiment III was conducted in the field to evaluate the interrelation between PGPB and AMF in micropropagated plants of cassava from "BRA Pretinha III" cultivar. The experimental design was of randomized blocks with 10 treatments (3 individual bacterial strains and 4 mixed + 3 controls (TA + AMF, TN + AMF and TA without AMF), with four replications. The variables analyzed in the experiments were: bacterial colonization, survival rate, plant height, root length, stem diameter, shoot and root dry matter, shoot and roots dry matter yield, relation between shoot/root dry matter, glomerospores number, mycorrhizal colonization, accumulated nitrogen, P content, % of crude protein and starch content. In the results, it was found that the analysis of scanning electron microscopy (SEM) showed a satisfactory colonization in the roots of inoculated plants, with the exception of plants inoculated with *Paenibacillus* genus bacteria. The strains used, although not homologous, optimized cultivars "BRA Pretinha III" and "BRS Poti Branca" under aseptic conditions, which may confer greater tolerance

to abiotic stresses promoted by the transfer of the plant from *in vitro* to *ex vitro*. The PGPBs provided better performance to the "BRA Pretinha III" cultivar in relation to the "BRS Poti Branca" in cassava. In greenhouse, PGPBs strains inoculated in the cv. "BRA Pretinha III" cassava influenced mycorrhizal colonization and glomerospores number, as well as synergistic effects of *Glomus clarum* with PGPBs. The crude protein content revealed PGPBs contribution in nitrogen nutrition of cassava, where inoculated plants assimilated N in equal proportion with those who received mineral N. PGPBs joint inoculation in the presence of *Glomus clarum* promoted a better performance in plant growth, demonstrating compulsory mycotrophism. PGPBs and AMF co-inoculation can meet the need of N for cassava, implying in reduced use of nitrogen fertilizer. In field, PGPBs strains inoculated in the cv. "BRA Pretinha III" cassava also influenced mycorrhizal colonization and glomerospores number. Micropropagated cassava plants showed low productivity, suggesting that it was due to cultivation in the first generation. The starch content in cassava was satisfactory to the values required by the industry. The applied dose of nitrogen fertilizer have not contributed in optimizing the cv. "BR Pretinha III" cassava in any evaluated variable, inferring low economic and ecological cost with microorganisms application. The arbuscular mycorrhizal fungi identified in the study area should be isolated and multiplied for use as inoculum in future research, as well as to enhance studies with new biological inputs formulations for cassava, aimed at increasing the productivity of this crop under conditions of micropropagation and/or spread in the field.

Keywords: PGPB, AMF, micropropagation, seedling production, acclimatization, synergism, productivity, Spodosol

1. Introdução geral

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) constitui uma das culturas mais exploradas na agricultura mundial, ocupando cerca de 20 milhões de hectares no mundo com uma produção de aproximadamente 276 milhões de toneladas de raízes tuberosas (FAO, 2014). A razão de sua ampla difusão se deve, principalmente, à capacidade de adaptação a diferentes condições de clima e solo, além da facilidade de cultivo e suas várias formas de utilização. Tradicionalmente, é um dos alimentos básicos utilizados pelo homem nas regiões tropicais e estima-se que milhões de pessoas dependem da mandioca na África, Ásia e América Latina, não só como uma importante reserva contra a fome para as populações carentes, mas também como geração de emprego e renda (OLUKUNLE, 2013).

O Brasil destaca-se entre os principais países produtores de mandioca e ocupa a 4ª colocação no ranking mundial com 21 milhões de toneladas, sendo superado pela Indonésia, Tailândia e Nigéria. Cultivada em todas as regiões agrícolas brasileiras, predominantemente nas pequenas unidades familiares, ocupa o quinto lugar da lista dos principais produtos quantitativamente produzidos, atrás do leite de vaca integral fresco, soja, milho e cana de açúcar (FAO, 2014), tendo como maiores produtores os estados do Pará, Paraná, Bahia, Maranhão, Rio Grande do Sul e São Paulo.

Embora o Brasil esteja entre os principais países produtores contribuindo com 7,6% da produção mundial, no início da década de 70 ele foi o maior produtor, alcançando um volume de 30 milhões de toneladas em uma área de 2,0 milhões de hectares, colaborando com 31% da produção mundial. produtos agrícolas; menor consumo animal se comparado à década de 70; redução no consumo humano de farinha; baixa disponibilidade de manivas-mente de boa qualidade genética e fitossanitária para o plantio, além da baixa produtividade da cultura, pelo uso de variedades pouco produtivas (SILVEIRA & CARDOSO, 2013).

Tendo em vista que a mandioca é uma cultura potencialmente suscetível a inúmeras pragas e doenças que podem ser transmitidas de um ciclo a outro da cultura (IGLESIAS et al., 1994), técnicas de propagação *in vitro* têm sido aplicadas para recuperar o vigor e produtividade, além de viabilizar a rápida multiplicação de um elevado número de mudas idênticas à planta matriz, livres

de pragas e doenças durante todo o ano (MARÍN et al., 2009). Entretanto, esta técnica, além de eliminar os micro-organismos fitopatogênicos, elimina também micro-organismos que podem ser vantajosos para o crescimento e o desenvolvimento das plantas (PANICKER et al., 2007).

Diante dessa problemática, nos últimos anos, uma tecnologia que tem sido usada positivamente para melhorar muitos parâmetros de crescimento e produtividade das plantas é a inoculação de micro-organismos capazes de colonizar o ambiente radicular, concorrer com a biota do solo e exercer benefícios que promovam o crescimento da planta. Entre estes micro-organismos, as bactérias promotoras de crescimento de plantas são bactérias que podem ser isoladas de diversos ambientes (FIGUEIREDO et al., 2010a; CHANWAY et al., 2014) possuindo a capacidade de colonizar a superfície de raízes, a rizosfera e a filosfera, bem como os tecidos vegetais internos, modulando o metabolismo da planta e estimulando seu crescimento e produtividade por mecanismos diretos e/ou indiretos (KLOEPPER et al., 1989; FIGUEIREDO et al., 2010b).

Os fungos micorrízicos merecem destaque, pois interagem com a maioria das plantas terrestres formando simbioses. Entre os vários tipos de micorrizas, as arbusculares são formadas entre raízes de plantas e fungos do solo do filo Glomeromycota (SCHÜßLER et al., 2001), as quais são caracterizadas pela presença endógena de arbúsculos nas células do córtex radicular, resultando em uma ampliação da área de exploração do sistema radicular e, assim, a capacidade da planta de absorver água e nutrientes, em especial aqueles que apresentam baixa mobilidade no solo, além disso, amenizam os estresses causados por diversos fatores (patógenos, variações de temperatura, metais pesados, etc.) e auxiliar no processo de formação de agregação do solo (STÜMER & SIQUEIRA, 2013).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade da inoculação com bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs) e *Glomus clarum* em mandioca micropropagada, avaliando combinações de micro-organismos que otimizem a produtividade desta cultura, visando uma agricultura sustentável.

2. Fundamentação teórica

2.1 A cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)

A mandioca é uma planta heliófila, perene, arbustiva, com raízes tuberosas, pertencente à família Euphorbiaceae. Originária do continente americano, sua difusão em outros continentes se deve à capacidade de adaptação a diferentes condições de clima e solo, facilidade de cultivo e, principalmente, por apresentar maior eficiência biológica, convertendo a maior quantidade de energia solar em carboidratos por unidade de área (250.10^3 cal/ha/dia) do que outras culturas, como milho, arroz, sorgo e trigo (OKIGBO, 1980), visto que suas raízes frescas apresentam um teor de carboidratos que varia de 32% a 35%, e de 80% a 90% na matéria seca. Destes, 80% na forma de amido (GIL & BUITRAGO, 2002).

O fato de suas raízes acumularem um elevado teor de carboidratos, fez com que essa parte seja a mais consumida diariamente como fonte alimentar por aproximadamente 500 milhões de pessoas nos trópicos e nos países africanos, como República Democrática do Congo, Gana, Moçambique e Angola onde ela tem proporcionado até um terço das calorias diárias (FAO, 2014). Entretanto, o valor nutricional das raízes de mandioca não se restringe apenas a hidratos de carbono. Há, também, em sua composição fibras (1,5 - 3,5%), lipídios (0,35 - 0,45%), proteína bruta (1,0-1,8%) (PURSEGLOVE, 1988; CHARLES et al, 2005), vitaminas (tiamina, riboflavina, niacina, ácido ascórbico, A) e minerais (cálcio, ferro, potássio, cobre, magnésio, zinco e manganês) (MONTAGNAC et al., 2009).

Além dos produtos que têm as raízes como matéria-prima básica para alimentação humana (chips, farinha, bolos, mingaus, fécula etc.), animal e industrial (amido, amido fermentado, farinhas, raspas, álcool etílico, acetona), sua parte aérea (constituída de folhas e hastes), apesar de ser caracterizada como resto cultural, também é utilizada na alimentação humana e animal (FAKIR et al., 2013) .

Cultivada em cerca de 20 milhões de hectares no mundo, com uma produção compartilhada quase totalmente pelos continentes africano (57%), asiático (31%) e americano (10%), a mandioca está entre os sete principais produtos agrícolas do mundo em volume de produção; e a Nigéria vem

liderando com 54 milhões de toneladas, seguida da Tailândia, Indonésia e Brasil com uma produção de 30, 24 e 21 milhões de toneladas, respectivamente (FAO, 2014).

Sua produção está se expandindo passando de 98 milhões de toneladas em 1970 para 276 milhões de toneladas em 2014. Três causas podem explicar este crescimento: em primeiro lugar, a demanda por mandioca aumentou devido ao rápido crescimento populacional e aumento da pobreza, assim incentivando os consumidores a procurar fontes de calorias mais baratas; em segundo lugar, as pesquisas genéticas e melhores práticas agrícolas impulsionaram a produção de mandioca; em terceiro lugar, o aumento do uso industrial da mandioca na Ásia, especialmente para a produção de etanol (FAO, 2012).

Um dos fatores que determina a forma de aproveitamento das raízes de mandioca, se para indústria ou consumo humano, é o conteúdo de compostos cianogênicos – HCN. Na mandioca estes compostos são sintetizados nas folhas e armazenados nas raízes (BAINBRIDGE et al., 1998), os quais variam substancialmente em razão da variedade, das condições de cultivo, da época de colheita e das condições ambientais (LORENZI, 2003).

Variedades chamadas doces caracterizam-se por apresentarem níveis baixos de cianetos ($<100 \text{ mg kg}^{-1}$) de polpa de raízes frescas e podem ser consumidas com segurança após processos de cozimento normais. Já o grupo das variedades com concentrações de cianeto na raiz fresca acima 100 mg kg^{-1} de polpa são chamadas amargas (BORGES et al., 2002) e precisam de um preparo adequado para o consumo humano. Por esta razão, essas variedades são normalmente utilizadas em processos industriais.

Nesse sentido, dependendo do uso final da mandioca, ela pode ser classificada como mandioca de mesa, quando destinada ao comércio “in natura”, e como mandioca industrial, quando é transformada em farinha e fécula (CEBALLOS, 2002). Na África e nas Américas a produção da mandioca é destinada basicamente ao consumo humano através de uso “in natura”, sendo subutilizada em seu potencial produtivo, pois o componente mais importante da raiz da mandioca é a fécula, a qual é usada na forma bruta ou modificada, e tende a crescer como insumo na indústria alimentícia, química, têxtil, farmacêutica, entre outros (LORENZI, 2003).

Na Ásia, a cadeia produtiva da mandioca tem se desenvolvido rapidamente e este desenvolvimento parece estar ancorado em variedades mais produtivas com rendimento bem acima da produtividade média mundial, tornando-a a maior exportadora de subprodutos da mandioca (HOWELER, 2003).

Entretanto, apesar do consumo *per capita* da mandioca ser elevado na África (62 kg hab⁻¹ ano⁻¹) e América do Sul (31,8 kg hab⁻¹ ano⁻¹), bem como sua vasta utilização em produtos industriais na Ásia, seu rendimento médio global é muito baixo (13 t ha⁻¹). Isso se deve principalmente à sua expansão ter ocorrido em áreas de solos pobres e marginais, cultivada quase exclusivamente em minifúndios, uma vez que os melhores solos são destinados, geralmente, a culturas consideradas nobres, do ponto de vista econômico (SOUZA et al., 2006a).

2.2 Panorama da cultura da mandioca no Brasil

No Brasil, a cultura da mandioca de mesa ou industrial tem uma importância econômica, social e cultural significativa. Cultivada em quase todo o Território Nacional, ocupando uma área de 1,5 milhões de hectares e com uma produção de 21 milhões de toneladas de raiz, é a base econômica de milhares de pequenas propriedades e a segurança alimentar de milhões de brasileiros, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país, o qual tem como maiores produtores os estados do Pará, Paraná, Bahia e Maranhão que, juntos, representam cerca de 55% da produção nacional (IBGE, 2014).

Embora o país ocupe a 4ª colocação no ranking entre os principais países produtores, a participação brasileira na produção mundial já atingiu 30% em 1970, colaborando com 31% desta produção; porém, atualmente, se situa em torno de 8% (FAO, 2014). Esta redução tem sido atribuída a diversos fatores como: forte avanço nos plantios na África e Ásia; substituição dessa cultura por outros produtos agrícolas, levando à redução de áreas de plantio da mandioca, principalmente as que apresentavam alta produtividade (NASSAR, 2006); menor consumo animal se comparado à década de 70, atualmente substituída pelas rações balanceadas; redução no consumo humano de farinha, dando lugar e preferência às massas de trigo; escassez de mão-de-

obra; fortes secas prolongadas na região Nordeste (SEAB, 2013) e baixa disponibilidade de manivas-semente de boa qualidade genética e fitossanitária para o plantio (SOUZA et al. 2009).

Outro aspecto importante está relacionado com a produtividade da raiz de mandioca que, apesar de sua importância socioeconômica, tem apresentado ao longo de décadas uma baixa média nacional, em torno de 13 t ha⁻¹ (IBGE, 2014). Isto tem sido atribuído ao fato dessa cultura ser considerada rústica, em virtude de sua notável tolerância a estresses abióticos, sendo comumente cultivada em solos com baixo teor de nutrientes, em geral aqueles considerados inaptos para a maioria dos cultivos; ser cultivada predominantemente por pequenos agricultores carentes em recursos técnicos e econômicos que pouco utilizam calcário e adubos, e pela pouca ou nenhuma utilização das tecnologias disponíveis (FUKUDA et al., 1997).

Apesar da mandioca apresentar grande capacidade de adaptação, ela extrai elevadas quantidades de nutrientes do solo. Em média, para cada tonelada de raiz produzida, podem ser extraídos do solo 2,33 e 4,91 kg de N, 0,52 e 1,08 kg de P, 4,11 e 5,83 kg de K, 0,61 e 1,83 kg de Ca e 0,34 e 0,79 kg de Mg, acumulados, respectivamente, nas raízes e na planta total (LORENZI, 1978; HOWELER, 1981), além do que, de todo o material colhido (raízes e parte aérea), praticamente quase nada retorna ao solo sob a forma de resíduos culturais (GOMES & SILVA, 2006).

Agregando-se a estes fatos, outro aspecto que está arraigado às práticas cotidianas de algumas regiões é o cultivo contínuo em uma mesma área, além do que, entre as culturas anuais, a mandioca possui brotação e desenvolvimento lentos na fase inicial, o que acarreta pouca proteção ao solo e, conseqüentemente, deixa os mandiocais sujeitos a acentuadas perdas de solo e água por erosão (FIALHO & VIEIRA, 2011), contribuindo para a degradação da estrutura do solo, o que também faz decrescer a produtividade a cada ano, pois, mesmo produzindo em solos exauridos, é uma cultura que esgota os solos, não garantindo sua produção ao longo do tempo (SOUZA et al., 2006a).

Assim, torna-se imprescindível a adoção de práticas de manejo sustentável do solo visto que, em condições ótimas, o potencial de produtividade dessa cultura pode alcançar 80 – 90 t ha⁻¹ ano⁻¹ (EL-SHARKAWY, 2012), sendo essencial a utilização de adubação adequada, a

adoção de práticas de controle da erosão do solo, consorciação, cultivo em aléias, preparo reduzido do solo, além de plantios em fileiras duplas e rotação de culturas (SOUZA et al., 2006a).

A questão dessa cultura tolerar baixas condições de fertilidade química do solo produzindo satisfatoriamente, mesmo sem a aplicação de fertilizantes como é tradicionalmente cultivada (EZETA & CARVALHO, 1982), tem sido relacionada à associação de micro-organismos envolvidos na nutrição com nitrogênio, fósforo e outros nutrientes do solo. Estudos evidenciaram que a ocorrência de bactérias diazotróficas na mandioca e a associação de suas raízes com fungos micorrízicos arbusculares, são capazes de exercer efeitos significativos no crescimento e rendimento da mandioca (BALOTA et al., 1997).

2.3 Micropropagação da mandioca

Diante da relevância dessa atividade agrícola nas regiões Norte e Nordeste e com a finalidade de promover a redução das desigualdades regionais e a inclusão social, gerando ocupação produtiva e melhor nível de renda, vários órgãos de pesquisa estão desenvolvendo novas variedades de mandioca e melhorando as já existentes, objetivando recuperar o vigor, o incremento do rendimento das raízes e a resistência a pragas e doenças, empregando técnicas de cultura de tecido como uma forma de superar os problemas associados ao método de propagação tradicional (SOUZA et al., 2009).

Como a mandioca é tradicionalmente propagada vegetativamente, mediante a semeadura de pedaços do caule (manivas-sementes), frequentemente observa-se no momento da colheita um número inferior de plantas em relação ao de manivas plantadas, devido a não brotação de manivas ou à morte de plantas, levando a uma desuniformidade no desenvolvimento das plantas, e isto se deve ao envelhecimento fisiológico causado por multiplicações sucessivas, associadas à falta de seleção do material de plantio e no acúmulo de patógenos nas suas manivas (SOUZA et al., 2006b).

Outro aspecto em espécies propagadas assexuadamente é a utilização de material de plantio infectado, o qual pode se constituir num importante

veículo de disseminação de pragas e doenças, contribuindo para uma significativa redução no rendimento além do que, a taxa de multiplicação da mandioca é baixa, haja vista que por esta via obtem-se, em média, 8 a 12 estacas de uma planta madura com 12 meses de vida (MATTOS et al., 2006).

Nesse sentido, a técnica de propagação vegetativa *in vitro*, também denominada micropropagação em função do tamanho dos propágulos utilizados, é considerada a aplicação mais concreta e de maior impacto da cultura de tecidos vegetais (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998), visto que ela viabiliza, em um curto espaço de tempo, um elevado número de material de plantio idêntico à planta matriz e com excelentes condições sanitárias, permitindo o estabelecimento de plantios em larga escala bastante uniformes (RAAMAN & PATHARAJAN, 2006) e com rendimentos superiores aos obtidos em cultivos convencionais (MATTOS et al., 2006), além de conservar o germoplasma de mandioca com rendimentos mais elevados (VAN STADEN et al., 2008).

Apesar dos múltiplos benefícios promovidos por essa biotecnologia, às mudas micropropagadas apresentam menos vigor e baixo desempenho, quando transferidas das condições *in vitro* para *ex vitro*, tornando-se mais suscetíveis a estresses ambientais (MELLO et al., 2002). Isto ocorre devido ao sistema estéril e asséptico no qual as plantas são produzidas, eliminando micro-organismos que podem favorecer o estabelecimento das mudas micropropagadas (PANICKER et al., 2007), visto que alguns destes micro-organismos produzem ou induzem à produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens às plantas hospedeiras como: o aumento de tolerância a estresses abióticos (BOGINO et al., 2013), a promoção de crescimento (SHARMA et al., 2014) e o controle biológico de fitopatógenos (LIU et al., 2014). Tais micro-organismos são definidos como endofíticos, pois vivem inter e intracelularmente dentro dos tecidos da planta, sem induzir sintomas patogênicos enquanto interagem com o hospedeiro bioquimicamente e geneticamente (SCHULZ & BOYLE, 2006).

2.4 Bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs)

Frente a esse cenário, os micro-organismos representados por seres pertencentes aos domínios Archaea, Bacteria e Eukarya merecem destaque,

uma vez que desempenham atividades que asseguram a estabilidade e produtividade dos sistemas agrícolas e ecossistemas naturais, por participarem ativamente dos ciclos biogeoquímicos e da ciclagem de matéria orgânica, além de estabelecer interações diversas com os demais seres vivos sendo, portanto, fundamentais para a manutenção e sobrevivência das comunidades vegetais e animais (MOREIRA & CAMPOS, 2013).

Entre estes micro-organismos, as bactérias representam domínio mais abundante, como também desempenham papel importante na ciclagem de nutrientes. Um desses processos é a fixação biológica de nitrogênio (FBN) atmosférico, que é realizada por bactérias conhecidas como diazotróficas, as quais apresentam alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética. Tal diversidade garante a ocorrência delas nos mais diferentes habitats, podendo ser de vida livre, estar associadas a espécies vegetais ou, ainda estabelecer simbiose com leguminosas (GLICK, 2012; MOREIRA et al., 2013a).

Quando livres no solo, as bactérias não interagem com a planta, mas realizam a FBN para suprir suas necessidades, independentemente da planta. Já quando associadas, as bactérias colonizam o interior das plantas, superfícies de raízes, caules, colmos e folhas, nos quais realizam a FBN, sem formar estruturas específicas. Nas simbioses, estabelece-se uma interação com compatibilidade genética, bioquímica e fisiológica, em que há formação de uma estrutura específica, pela qual ocorrem trocas entre o simbiote (bactéria) e o hospedeiro (planta), onde a bactéria fornece nitrogênio (N) para a planta em troca de carboidratos (MOREIRA et al., 2013b).

Sendo o N um nutriente de grande importância agrícola devido à sua elevada demanda pelas plantas, é necessário que ele esteja disponível no solo e que entre em contato com as raízes. No entanto, vários solos, principalmente na região tropical, não possuem teores de N-disponível para suprir em quantidades suficientes o crescimento vegetal, resultando em menor produção agrícola. Para garantir uma boa produtividade é necessário que esse nutriente seja aportado ao sistema pela adição de compostos ricos nesse elemento (esterco, restos culturais, adubos verdes e fertilizantes químicos) (SANTOS et al., 2008).

No entanto, para a cultura da mandioca, o custo dos adubos químicos e/ou orgânicos, quando adquirido fora da propriedade, pode chegar a 35% –

40% do custo de produção, o que torna a prática inviável para a maioria dos pequenos agricultores. Além disso, na região semiárida do nordeste brasileiro, onde a mandioca é a base alimentar dos sistemas agrícolas de pequenos produtores, a reposição de nutrientes utilizando adubos químicos praticamente não existe (SOUZA et al., 2006a).

Nesses modelos de agricultura, tecnologias que envolvam o processo de FBN muitas vezes afirmam-se como a única possibilidade de viabilização e sustentabilidade da agricultura (CATTELAN & GRASSANO, 2007; GLICK, 2012). Portanto, graças a esses sistemas fixadores de nitrogênio, o gás N_2 presente abundantemente na atmosfera em sua forma mais estável, é capaz de transformar o N_2 presente no ar, em amônia (NH_3), forma que pode ser absorvido pelas plantas e, assim, ser incorporado aos compostos orgânicos.

Além de fixar nitrogênio e contribuir diretamente com a nutrição vegetal de várias espécies como milho, arroz, braquiária e cana-de-açúcar a interação entre bactérias diazotróficas associativas e plantas também exerce outros benefícios que auxiliam, direta ou indiretamente, o crescimento vegetal. Assim, tais bactérias são consideradas promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) e podem ser isoladas de várias espécies vegetais (MOREIRA et al., 2010; SARKAR & REINHOLD-HUREK, 2014).

Os principais mecanismos mediante os quais as BPCPs promovem o crescimento das plantas de forma direta e indireta compreendem: solubilização de fosfatos inorgânicos (RICHARDSON & SIMPSON, 2011) auxiliando a planta na absorção de fósforo; solubilização de zinco (SARATHAMBAL et al., 2010); oxidação de enxofre (EL-TARABILY et al., 2006), síntese de fitormônios como auxinas e giberelinas e citocininas (KUREPIN et al., 2014); síntese de sideróforos, atuando na quelatização de íons de ferro, e como agentes biopesticidas, reduzindo a intensidade do inóculo ou das atividades determinantes da fitomoléstia (MALFANOVA et al., 2011).

Entre esses mecanismos, a síntese de fitormônios pelas BPCPs é, provavelmente, um dos mecanismos mais importantes sobre o desenvolvimento vegetal, visto que a produção destes reguladores de crescimento faz parte do metabolismo de diversas espécies de bactérias associadas aos vegetais. Os principais efeitos relacionados com a ação de fitormônios produzidos por micro-organismos sobre o desenvolvimento vegetal consistem em alterações morfológicas no sistema radicular, incluindo aumentos

no comprimento e volume radicular, número e comprimento das raízes laterais (BASHAN & DE-BASHAN, 2010; CASSÁN et al., 2014). Estes efeitos têm sido associados ao aumento da resistência vegetal contra estresses hídricos e nutricionais e ao aumento da eficiência de uso da água e de fertilizantes (FIGUEIREDO et al., 2008; CARVALHAIS et al., 2013).

BPCP tem sido identificado em vários gêneros de alfa e beta proteobactéria, incluindo *Actinoplanes*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Amorphosporangium*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Cellulomonas*, *Citrobacter*, *Derrxia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Streptomyces* e *Xanthomonas* (SPAEPEN et al., 2009; DASH & GUPTA, 2001; SAHARAN & NEHRA, 2011).

Azospirillum, *Acetobacter* e *Herbaspirillum* são os exemplos de gêneros mais conhecidos de bactérias associativas. No entanto, apesar da contribuição das bactérias associativas para nutrição vegetal já ter sido comprovada por métodos que utilizam ^{15}N , essa contribuição não é tão expressiva como nos sistemas simbióticos, pois estas estão em íntima relação com a planta, o que minimiza perdas por interferência dos inúmeros fatores químicos, físicos e biológicos do solo (MOREIRA et al., 2013b).

Assim, o uso de combinações de isolados com diferentes capacidades metabólicas (FBN, mobilização-P, produção de fitormônios e antibióticos) tem sido recomendado para aumentar a eficiência de biofertilizantes contendo BPCPs em plantas leguminosas (ARAÚJO & HUNGRIA, 1999; FIGUEIREDO et al., 2008; RODRIGUES et al., 2012) e não leguminosas (OLIVEIRA et al., 2006; BASHAN et al., 2014), principalmente em solos que apresentam baixos teores de matéria orgânica e alta fixação de fósforo (P), o que os torna pouco eficientes em fornecer nitrogênio e fósforo para as plantas, limitando a produção.

2.5 Fungos micorrízicos arbusculares (FMA)

Os fungos micorrízicos têm sido sugeridos como uma alternativa para a biofertilização, visto que micorrizas são associações simbióticas estabelecidas entre raízes e fungos do solo que têm efeitos diretos e indiretos sobre a planta

hospedeira. Esses efeitos podem ser fisiológicos, nutricionais e bioprotetores, mas são os efeitos nutricionais os que podem melhorar o crescimento e produtividade das plantas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; SMITH & READ, 2008; HODGE & STORER, 2015).

Existem diferentes tipos de micorrizas formadas a partir de combinações entre diferentes filios de fungos com diferentes grupos de plantas hospedeiras, os quais se distinguem morfológicamente, formando tipos anatômicos e funcionais de micorrizas conhecidas como: micorrizas arbusculares (FMA), ectomicorrizas, micorrizas orquidoides, micorrizas ericoides, micorrizas arbutoides, micorrizas monotropoides e ectendomicorrizas. O que as diferencia é o modo de penetração intrarradicular da hifa fúngica. Nos FMA, há formação de estruturas especializadas denominadas vesículas e arbúsculos nas células do córtex da raiz que penetram na parede celular da planta (STÜMER & SIQUEIRA, 2013).

Esta capacidade de formar FMA é restrita a fungos pertencentes ao filo Glomeromycota (SCHÜßLER, 2001; OEHL & SIEVERDING, 2004; SIEVERDING & OEHL, 2012), organizados em três classes, compostas por 5 ordens, 14 famílias, 29 gêneros (OEHL et al., 2011) e com cerca de 250 espécies (JANSA et al., 2014). Todos os organismos deste filo são biotróficos obrigatórios que se associam com praticamente 90% das plantas vasculares e mais de 80% de todas as plantas terrestres (SMITH & READ, 1997; WANG & QUI, 2006), em maior ou menor grau de micotrofismo (JANOS, 1987). Além disso, é provável que eles sejam os fungos de solo mais abundantes na maioria dos ecossistemas tropicais, principalmente nos sistemas agrícolas, onde os solos são, em geral, ácidos e pobres em nutrientes (NOTTINGHAM et al., 2013).

O estabelecimento desta simbiose micorrízica arbuscular resulta de uma sequência complexa de interações entre as hifas fúngicas e as células das raízes. Entre essas interações estão estímulos químicos e quimiotropismo para germinação e direcionamento das hifas no solo; reconhecimento dos sinais moleculares para a formação de apressórios na superfície das raízes; regulação funcional e compatibilidade entre a planta e o fungo, envolvendo, provavelmente, hormônios e proteínas específicas para colonização do córtex radicular e formação de estruturas como arbúsculos, vesículas e esporos. Além do crescimento intrarradicular, os FMA formam uma imensa rede micelial que

explora microambientes não alcançados pelas raízes (SIQUEIRA et al., 1991; LAMBAIS & RAMOS, 2010).

Esses mecanismos de regulação ainda são pouco conhecidos; no entanto, todos esses passos são modulados pelo ambiente, particularmente pela disponibilidade de nutrientes no solo, principalmente de fósforo (P). Em condições de baixa concentração deste nutriente, a simbiose desenvolve-se plenamente enquanto que, em condições inversas, seu desenvolvimento é restrito. Assim sendo, solos com baixa disponibilidade de P são favoráveis à micorrização, condição onde a planta pode obter o maior benefício desta simbiose (ELBON & WHALEN, 2014).

Do ponto de vista agrônômico, plantas colonizadas com FMA podem ser favorecidas na absorção de nutrientes inorgânicos como fósforo (SMITH et al., 2012), nitrogênio (MATSUMURA et al., 2013), ferro (CARIS et al., 1998), zinco, cobre, cádmio (LI et al., 1991; BÜRKERT & ROBSON, 1994; CABALA et al., 2009) e boro (CLARK & ZETO, 2000), além de proteger contra patógenos radiculares contribuindo como maiores taxas de crescimento, sobrevivência e alocação de biomassa (JUNG et al., 2012).

Outros aspectos que têm dado ênfase sobre os benefícios dos FMA são: de amenizar os estresses das plantas causados pela presença de elementos tóxicos no solo (ZHENG et al., 2015), de aumentar a tolerância e resistência a solos salinos (MAIA & YANO-MELO, 2005; ESTRADA et al., 2013), de interferir nas relações água-planta aumentando a tolerância ao déficit hídrico (BASLAM et al., 2014), além de auxiliar no processo de formação de agregados do solo (PENG et al., 2013), o que melhora tanto a conservação da água como a aeração do solo: dois fatores que impactam diretamente o crescimento das plantas (STÜMER & SIQUEIRA, 2013).

Embora os FMA sejam componentes importantes nos ecossistemas naturais, eles não apresentam especificidade em relação ao hospedeiro; porém, as espécies vegetais exibem variado grau de dependência micorrízica (JANOS, 1987; MIRANDA, 2008). Tal característica depende exclusivamente do genoma da planta, o qual varia de acordo com a influência de outras características genéticas da planta, como: exigência nutricional, eficiência da absorção das raízes, taxa de crescimento, reserva de nutrientes da semente, além da distribuição e morfologia do sistema radicular (HETRICK et al., 1996).

A mandioca, como muitas espécies de plantas da região tropical, exibe um hábito e um grau considerável de dependência micorrízica para seu crescimento ideal (HABTE & BAYAPPANAHALLI, 1994; MERGULHÃO, 2001) e sabe-se que, na técnica de micropropagação, grande parte dos micro-organismos são eliminados, o que pode dificultar o estabelecimento das mudas e seu crescimento após o transplântio, tornando-as mais suscetíveis a estresses ambientais, como o ataque de micro-organismos sapróbios e eventuais patógenos (GRANGER et al., 1983).

Nesse sentido, diante dos potenciais benefícios da associação micorrízica arbuscular para as plantas, os FMA têm sido utilizados como uma ferramenta biotecnológica em sistemas de micropropagação de plantas com resultados positivos na redução do tempo de aclimatização (ESTRADA-LUNA & DAVIES, 2003; KAPOOR et al., 2008); na melhoria da nutrição das plantas (SMITH & SMITH, 2012) e na maior tolerância a estresses causados por patógenos nas raízes (LOVATO et al., 2014).

3. Referências bibliográficas

ARAÚJO, F.F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum/Bradyrhizobium elkanii*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 34, p. 1633-1643, 1999.

BAINBRIDGE, Z.; HARDING, S.; FRENCH, L.; KAPINGA, R.; WESTBY, A. A study of the role of tissues disruption in the removal of cyanogens during cassava root processing. *Food Chemistry*, v. 62, p. 291-297, 1998.

BALOTA, E.L.; LOPES, E.S.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. Inoculação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos-arbusculares na cultura da mandioca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 32, p. 627-639, 1997.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. *Advances in Agronomy*, v. 108, p. 77–136, 2010.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.E.; PRABHU, S.R.; HERNANDEZ, J.-P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant and Soil*, v. 378, n. 1-2, p. 1-33, 2014.

BASLAM, M.; QADDOURY, A.; GOICOECHEA, N. Role of native and exotic mycorrhizal symbiosis to develop morphological, physiological and biochemical responses coping with water drought of date palm, *Phoenix dactylifera*. *Trees - Structure and Function*, v. 28, n. 1, p. 161-172, 2014.

BOGINO, P.; ABOD, A.; NIEVAS, F.; GIORDANO, W. Water-Limiting Conditions Alter the Structure and Biofilm-Forming Ability of Bacterial Multispecies Communities in the Alfalfa Rhizosphere. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e79614, 2013.

BORGES, M.F.; FUKUDA, W.M.G.; ROSSETTI, A.G. Avaliação de variedades de mandioca para consumo humano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 1559-1565, 2002.

BURKERT, B.; ROBSON, A. Zn uptake in subterranean clover (*Trifolium subterraneum*) by three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in a root free sandy soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, p. 1117–1124, 1994.

CABALA, J.; KRUPA, P.; MISZ-KENNAN, M. Heavy metals in mycorrhizal rhizospheres contaminated by Zn-Pb mining and smelting around olkusz in Southern Poland. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 199, n. 1-4, p. 139-149, 2009.

CARIS, C.; HORDT, W.; HAWKINS, H.J.; ROMHELD, V.; GEORGE, E. Studies of iron transport by arbuscular mycorrhizal hyphae from soil to peanut and sorghum plants. **Mycorrhiza**, v. 8, p. 35-39, 1998.

CARVALHAIS, L.C.; DENNIS, P.G.; FAN, B.; FEDOSEYENKO, D.; KIERUL, K.; BECKER, A.; VON WIREN, N.; BORRISS, R. Linking plant nutritional status to plant-microbe interactions. **PLOS One**, v. 8, p. e68555, 2013.

CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, p. 440-459, 2014.

CATTELAN, A.J.; GRASSANO, A. Protocolo para análise da qualidade e da eficiência agronômica de inoculante, estirpes e outras tecnologias relacionadas a bactérias promotoras do crescimento vegetal. In.: CAMPO, R.J.; HUNGRIA, M. Anais da XIII reunião da rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbianos de interesse agrícola (RELARE). Londrina, PR: EMBRAPA-CNPSo, p. 154-173. (**EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 290**), 2007.

CEBALLOS, H. La yuca em Colombiay el mundo: nuevas perspectivas para um cultivo milenario. In: OSPINA, B.; CEBALLOS, H. (Ed.). La yuca em el Tercer Milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Cali: **CIAT (Publication, n. 327)**, p. 586, 2002.

CHANWAY, C.P.; ANAND, R.; YANG, H. Nitrogen Fixation Outside and Inside Plant Tissues InTech, 2014.

CHARLES, A.L.; CHANG, Y.H.; KO, W.C.; SRIROTH, K.; HUANG, T.C. Influence of amylopectin structure and amylose content on the gelling properties of five cultivars of cassava starches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2717-2725, 2005.

CLARK, R.B.; ZETO, S.K. Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 23, n. 7, p. 867-902, 2000.

DASH, S.; GUPTA, N. Microbial bioinoculants and their role in plant growth and development. **International Journal Biotechnol Molecular Biology Research**, v. 2, p. 232–251, 2011.

ELBON, A.; WHALEN, J.K. Phosphorus supply to vegetable crops from arbuscular mycorrhizal fungi: a review. **Biological Agriculture & Horticulture**, p. 1-18, 2014.

EL-SHARKAWY, M.A. Stress-tolerant cassava: The role of integrative ecophysiology-breeding research in crop improvement. **Open Journal of Soil Science**, v. 2, n. 02, p. 162, 2012.

EL-TARABILY, K.A.; SOAUD, A.A.; SALEH, M.E.; MATSUMOTO, S. Isolation and characterisation of sulfur-oxidising bacteria, including strains of *Rhizobium*, from calcareous sandy soils and their effects on nutrient uptake and growth of maize (*Zea mays* L.). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 57, n.1, p. 101–111, 2006.

ESTRADA, B.; AROCA, R.; MAATHUIS, F.J.M.; BAREA, J.M.; RUIZ-LOZANO, J.M. Arbuscular mycorrhizal fungi native from a Mediterranean saline area enhance maize tolerance to salinity through improved ion homeostasis. **Plant, Cell and Environment**, v. 36, n. 10, p. 1771-1782, 2013.

ESTRADA-LUNA, A.A.; DAVIES JUNIOR, F.T. Arbuscular mycorrhizal fungi influence water relations, gas exchange, abscisic acid and growth of micropropagated chile ancho pepper (*Capsicum annuum*) planteds during acclimatization and post-acclimatization. **Journal of Plant Physiology**, Cambridge, v. 160, n. 9, p. 1073-1083, 2003.

EZETA, F.N.; CARVALHO, P.C.L. de. Influência da endomicorriza na absorção de P e K e no crescimento da mandioca. **Revista Brasileira Ciencia Solo**, v. 6, p. 25-28, 1982.

FAKIR, M.S.A.; JANNAT, M.; MOSTAFA, M. G.; SEAL, H. Starch and flour extraction and nutrient composition of tuber in seven cassava accessions. **Journal of the Bangladesh Agricultural University**, v. 10, n. 2, p. 217-222, 2013.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Agricultural production: Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.>Acesso dia 20/05/2014.

FAO. W.F.P. IFAD. The State of Food Insecurity in the World 2012. Economic growth is necessary but not sufficient to accelerate reduction of hunger and malnutrition. **Rome, FAO**, 2012.

FIALHO, J.F.; VIEIRA, E. Manejo e tratos culturais da mandioca. Mandioca no Cerrado: orientações técnicas. Planaltina, **Embrapa Cerrados**, p. 60-91, 2011.

FIGUEIREDO, M. V. B., SELDIN, Lucy, Araujo, F.F.de, Mariano, R.L.R. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications In: Plant growth and health promoting bacteria ed.Berlin: **Springer**, p. 21-43, 2010b.

FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; MARTINEZ, C.R.; CHANWAY, C.P. Alleviation of water stress effects in cammom bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation *Paenibacillus* x *Rhizobium tropici*. **Applied Soil Ecology**, v. 40, n. 1, p. 182-188, 2008.

FIGUEIREDO, M.V.B.; SOBRAL, J.K.; STAMFORD, T.L.M.; ARAÚJO, J.M. Bactérias promotoras do crescimento de plantas: estratégia para uma agricultura sustentável. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; OLIVEIRA, J.P.O.; SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P. Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais. Brasília: **EMBRAPA Agrobiologia**. Parte 4, cap.1, p.387-414, 2010a.

FUKUDA, W.M.G.; CAVALCANTI, J.; OLIVEIRA, S.L.; DELALIBERA, I.; IGLESIAS, C.; CALDAS, R.C. Efeito do estresse hídrico e do ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*) sobre variedades de mandioca no semi-árido. **Revista Brasileira de Mandioca**, v. 16, n. 1, p. 61-71, 1997.

GIL, L.; BUITRAGO, J. La yuca en la alimentación animal. In: OSPINA, B.; CEBALLOS, H. (Comp.). La yuca en el tercer milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Cali: CIAT, p. 527-568. (**Publicación CIAT, 327**), 2002.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, 2012.

GOMES, J.C.; SILVA, J. Correção da acidez e adubação. In: SOUZA, L.S.; FARIAS, A.R.N.; MATTOS, P.L.P.; FUKUDA, W.M.G. SOUZA. Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca. cap. 9. Cruz das Almas: **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, p. 70-214, 2006.

GRANGER, R.L.; PLENCHETTE, C.; FORTIN, J.A. Effects of a vesicular arbuscular (VA) endomycorrhizal fungus (*Glomus epigaeum*) on the growth and leaf mineral content of two apple clones propagated *in vitro*. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 63, p. 551-555. 1983.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: **Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq**, v.1, p. 43-76, 1998.

HABTE, M.; BAYAPPANAHALLI, M.N. Dependency of cassava (*Manihot esculenta* Cranz.) on vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, v. 4, p. 241-245, 1994.

HETRICK, B.A.D.; WILSON, G.W.T.; TODD, T.C. Mycorrhizal response in wheat cultivars: relationship to phosphorus. **Canadian of Journal Botany**. v. 74, p. 19-25, 1996.

HODGE, A.; STORER, K. Arbuscular mycorrhiza and nitrogen: implications for individual plants through to ecosystems. **Plant and Soil**, v. 386, n. 1-2, p. 1-19, 2015.

HOWELER, R. Cassava in Ásia: Present Situation and its Future Potential in Agro-Industry. CIAT Cassava Office for Ásia, **Departamento of Agriculture**, Bangkok. Thailand, 2003.

HOWELER, R.H. Nutrition mineral y fertilization de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Cali, **CIAT**, 55p. (Série 09 SC-4), 1981.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento sistemático da produção agrícola.-2013. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatística/indicadores/agropecuária/lspa/lspa_201404 >Acesso dia 20/05/2014.

IGLESIAS, C. Memorias de la Tercera Reunion Panamericana de Fitomejoradores de Yuca. Documento de Trabajo # 138. **CIAT**, Cali, Colombia. p. 279, 1994.

JANOS, D.P. VA mycorrhizas in humid tropical ecosystems. pp.107-134. In: G.R. Safir (ed.). Ecophysiology of VA mycorrhizal plants. **CRC Press**, Boca Raton, 1987.

JANSA, J.; ERB, A.; OBERHOLZER, H.-R.; ŠMILAUER, P.; EGLI, S. Soil and geography are more important determinants of indigenous arbuscular mycorrhizal communities than management practices in Swiss agricultural soils. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 8, p. 2118–2135, 2014.

JUNG, S.C.; MARTINEZ-MEDINA, A.; LOPEZ-RAEZ, J.A.; POZO, M.J. Mycorrhiza-Induced Resistance and Priming of Plant Defenses. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, n. 6, p. 651-664, 2012.

KAPOOR, R.; SHARMA, D.; BHATNAGAR, A.K. Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. **Scientia Horticulturae**, v. 116, n. 3, p. 227-239, 2008.

KLOPPER J.W.; LIFSHITZ R.; ZABLOTOWICZ R.M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 39-44, 1989.

KUREPIN, L.V.; ZAMAN, M.; PHARIS, R.P. Phytohormonal basis for the plant growth promoting action of naturally occurring biostimulators. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 9, p. 1715–1722, 2014.

LAMBAIS, M.R.; RAMOS, A.C. Sinalização e transdução de sinais em micorrizas arbusculares. In: SIQUEIRA, J. O.; SOUZA, F. A. de; CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M. Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil. Lavras: **UFPA**, p.119-132, 2010.

LI, X.; GEORGE, E.; MARSCHNER, H. Phosphorus depletion and pH decrease at the root - soil and hyphae soil interfaces of VA mycorrhizal white clover

fertilized with ammonium. **New Phytologist**, Cambridge, Grã-Bretanha, v. 119, n. 3, p. 397-404, 1991.

LIU, H.X.; LI, S.M.; LUO, Y.M.; LUO, L.X.; LI, J.Q.; GUO, J.H. Biological control of Ralstonia wilt, Phytophthora blight, Meloidogyne root-knot on bell pepper by the combination of *Bacillus subtilis* AR12, *Bacillus subtilis* SM21 and *Chryseobacterium* sp. R89. **European journal of plant pathology**, v. 139, n. 1, p. 107-116, 2014.

LORENZI, J.O. Mandioca. Campinas: **CATI**. 116p. (Boletim Técnico, 245), 2003.

LORENZI, J.O. Absorção de macronutrientes e acumulação de matéria seca para duas cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.). Piracicaba, 1978. 92p. **Dissertação (Mestrado)** - ESALQ-USP, 1978.

LOVATO, P.E.; GARCIA-FIGUERES, F.; CAMPRUBÍ, A.; PARLADÉ, J.; CALVET, C. A semi-axenic phototrophic system to study interactions between arbuscular mycorrhizal and pathogenic fungi in woody plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 140, n. 2, p. 207-212, 2014.

MAIA, L.C.; YANO-MELO, A.M. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in saline soils. In Mycorrhizas: role and applications (V.S. Mehrotra, ed.). **Allied Publishers**, New Dehli, p. 282-302, 2005.

MALFANOVA, N.; KAMILOVA, F.; VALIDOV, S.; SHCHERBAKOV, A.; CHEBOTAR, V.; TIKHONOVICH, I.; LUGTENBERG, B. Characterization of *Bacillus subtilis* HC8, a novel plant-beneficial endophytic strain from giant hogweed. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 523-532, 2011.

MARÍN, A.; ALBARRÁN, J.G.; FUENMAYOR, F.; PERDOMO, D. Evaluación del efecto de los reguladores de crecimiento en la regeneración *in vitro* de cinco cultivares élites de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). **UDO Agrícola**, v. 9, n. 3, p. 556-562, 2009.

MATSUMURA, A.; TANIGUCHI, S.; YAMAWAKI, K.; HATTORI, R.; TARUI, A.; YANO, K.; DAIMON, H. Nitrogen Uptake from Amino Acids in Maize through Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, n. 12, p. 2290-2294, 2013.

MATTOS, P.L.P.; SOUZA, A.S., FILHO, J.R.F. Propagação. In: SOUZA, L.S.; FARIAS, A.R.N.; MATTOS, P.L.P.; FUKUDA, W.M.G. SOUZA, Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca. cap 16. Cruz das Almas: **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, p. 70-214, 2006.

MELLO, M.R.F.; MARIANO, R.L.R.; MENEZES, M.; CÂMARA, T.R.; ASSIS, S.M.P. Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. **Summa Phytopathologica**, v. 28, p. 222-228, 2002.

MERGULHÃO, A.C.E.S. Efeito da inoculação pelo fungo micorrízico arbuscular (*Entrophospora colombiana*) em mudas micropropagadas de mandioca através

do sistema aeropônico. **Ecossistema** (UniPinhal) , Espírito Santo do Pinhal - SP, v. 26, p. 125-128, 2001.

MIRANDA, J.C.C. Cerrado: Micorriza arbuscular, ocorrência e manejo. Planaltina: **Embrapa Cerrados**, 169p. 2008.

MONTAGNAC, J.A.; DAVIS, C.R.; TANUMIHARDJO, S.A. Nutritional value of cassava for use as a staple food and recent advances for improvement. **CRFSFS**, v. 8, p. 181-194, 2009.

MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R.S.A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n. 2, p. 74 – 99, 2010.

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

MOREIRA, F.S.; CAMPOS, C.R.A. Micro-organismos. In: MOREIRA, F.S.; CARES, J.E.; ZANETTI, R.; STÜMER, S.L. O ecossistema do solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal. Lavras: Ed. **UFLA**. cap. 11, p. 201-221, 2013.

MOREIRA, F.S.; LIMA, A.S.; JESUS, E.C.; SILVA, K.; NOBREGA, R.S.A.; FLORENTINO, L.A. Bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico que nodulam leguminosas. In: MOREIRA, F.S.; CARES, J.E.; ZANETTI, R.; STÜMER, S.L. O ecossistema do solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal. Lavras: Ed. **UFLA**. cap.17, p. 325-340, 2013a.

MOREIRA, F.S.; NOBREGA, R.S.A.; FERNANDA, C.; SILVA, K. Bactérias associativas fixadoras de nitrogênio atmosférico. In: MOREIRA, F.S.; CARES, J.E.; ZANETTI, R.; STÜMER, S.L. O ecossistema do solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal. Lavras: Ed. **UFLA**. cap.18, p. 341-350, 2013b.

NASSAR, N.M.A. Mandioca: Uma opção contra a fome - estudos e lições do Brasil e do mundo. **Ciência Hoje**, v. 39, n. 231, p. 31-34, 2006.

NOTTINGHAM, A.T.; TURNER, B.L.; WINTER, K.; CHAMBERLAIN, P.M.; STOTT, A.; TANNER, E.V.J. Root and arbuscular mycorrhizal mycelial interactions with soil microorganisms in lowland tropical forest. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 85, n. 1, p. 37–50, 2013.

OEHL, F, SIEVERDING, E. Pacispora a new vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal genus in the *Glomeromycetes*. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v.78, p. 72–82, 2004.

OEHL, F.; SIEVERDING, E.; PALAENZUELA, J.; INEICHEN, K.; SILVA, G.A. Advances in *Glomeromycota* Taxonomy and classification. **IMAFUNGOS**. v. 2, n. 2, p. 191-199, 2011.

OKIGBO, B.N. Nutritional implications of projects giving high priority to the production of staples of low nutritive quality. In the case for cassava (*Manihot*

esculenta Crantz) in the humid tropics of West Africa. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 2, n. 4, p. 1-10, 1980.

OLIVEIRA, A.L. M.; CANUTO, E.L.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, n. 1-2, p. 23-32, 2006.

OLUKUNLE, O. T. "Evaluation of Income and Employment Generation from Cassava Value Chain in the Nigerian Agricultural Sector", **Asian Journal of Agriculture and Rural Development**, v. 3, n. 3, p. 79-92, 2013.

PANICKER, B.; THOMAS, P.; JANAKIRAM, T.; VENUGOPALAN, R.; NARAYANAPPA, S.B. Influence of cytokinin levels on *in vitro* propagation of shy suckering chrysanthemum "Arka Swarna" and activation of endophytic bacteria *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, v. 43, n. 6, p. 614-622, 2007.

PENG, S.; GUO, T.; LIU, G. The effects of arbuscular mycorrhizal hyphal networks on soil aggregations of purple soil in southwest China, **Soil Biology and Biochemistry**, v. 57, p. 411-417, 2013.

PURSEGLOVE, J.W. Tropical crops: Monocotyledons. Longman house, Burnt Mill, Harlow, **Essex**: New York, p. 261-286, 1988.

RAAMAN, N.; PATHARAJAN, S. Integration of arbuscular mycorrhizal fungi with micropropagated plants. In: Current Concepts in Botany (Mukerji, K.G. and Manoharachary, C. eds.) I.K. **International Publishing House**, India, 2006.

RICHARDSON, A.E.; SIMPSON, R.J. Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. **Plant Physiology**, v. 156, n. 3, p. 989-996, 2011.

RODRIGUES, A.C.; ANTUNES, J.E.L.; MEDEIROS, V.V. de; BARROS, B.G. de F.; FIGUEIREDO, M. do V.B. Resposta da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium sp.* em caupi. **Bioscience Journal**, v. 28, n. p. 196-202, 2012.

SAHARAN, B.S.; NEHRA, V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. **Life Sciences and Medicine Research**, v. 21, p. 1-30, 2011.

SANTOS, C.E. de. R. e. S.; FREITAS, A.D.S. de.; VIEIRA, I.M. de. M.B.; COLAÇO, W. Fixação simbiótica do N₂ em leguminosas tropicais. In: FIGUEIREDO, M. do V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORFD, N.P.; SANTOS, C.E.de.R.e.S. Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura. Guaíba: **Agrolivros**, p.17-41 2008.

SARATHAMBAL, C.; THANGARAJU, M.; PAULRAJ, C; GOMATHY, M. Assessing the Zinc solubilization ability of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in maize rhizosphere using labelled 65Zn compounds. **Indian Journal of Microbiology**, v. 50, n.1, p. 103 – 109, 2010.

SARKAR, A.; REINHOLD-HUREK, B. Transcriptional Profiling of Nitrogen Fixation and the Role of NifA in the Diazotrophic Endophyte *Azoarcus* sp. Strain BH72. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e86527, 2014.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. What are endophytes? (pp. 1-13). **Springer** Berlin Heidelberg, 2006.

SCHÜßLER, A.; GEHRIG, H.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. Analysis of partial Glomales SSU rRNA gene sequences : implications for primer design and phylogeny. **Mycological Research**, v. 105, n. 1, p. 5-5, 2001.

SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Mandioca - Análise da Conjuntura Agropecuária/Novembro de 2013. http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/mandioca_2013_14.pdf>Acesso dia 06/01/2014.

SHARMA, S. D.; KUMAR, P.; YADAV, S. K. *Glomus*–*Azotobacter* association affects phenology of mango seedlings under reduced soil nutrient supply. **Scientia Horticulturae**, v. 173, p. 86-91, 2014.

SIEVERDING, E.; OEHL, F. Revision of Entrophospora and description of Kuklospora and Intraspora, two new genera in the arbuscular mycorrhizal Glomeromycetes. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 80, n. 1, p. 69-81, 2012.

SILVEIRA, H.F. da.; CARDOSO, C.E.L. Rede de Multiplicação e Transferência de Materiais Propagativos de Mandioca com qualidade genética e fitossanitária para o estado da Bahia (RENIVA) - avanços e desafios: relato de experiência. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 15., 2013, Salvador. Inovação e sustentabilidade: da raiz ao amido: trabalhos apresentados. Salvador: CBM: **Embrapa**, 1 CD-ROM, 2013.

SIQUEIRA, J.O.; NAIR, M.G.; HAMMERSCHMIDT, R.; SAFIR, G.R. Significance of phenolic compounds in plant-soil microbial systems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 10, p. 63-121, 1991.

SMITH, S. E.; SMITH, F. A. Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. **Mycologia**, v. 104, n. 1, p. 1-13, 2012.

SMITH, S.E.; READ, D.J. Mycorrhizal symbiosis. London: **Academic Press**; Vesicular-arbuscular mycorrhizas; p. 9–160, 1997.

SMITH, S.E.; READ, D.J.; In: Mycorrhizal Symbioses. **Academic Press**, London, UK, 785p, 2008.

SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T.G.; JUNGHANS, D.T.; MENDES, R.M.; MONTARROYOS, A.V.V. Cultura de tecidos em mandioca: Técnicas e aplicações. In: SOUZA, L.S.; FARIAS, A.R.N.; MATTOS, P.L.P.; FUKUDA, W.M.G. SOUZA. Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca. cap. 8. Cruz das Almas: **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, p. 364-432, 2006b.

SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T.G.; SOUZA, F.V.D.; SANTOS-SEREJO, J.A. dos; SILVA NETO, H.P. da; MENEZES, M.C.; SILVEIRA, D.G.; SANTOS, V. da S. Micropropagação da mandioca. In: JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A. da S. (Ed.). Aspectos práticos da micropropagação de plantas. Cruz das Almas: **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, p. 323-349, 2009.

SOUZA, L.D.; SOUZA, L.S.; GOMES, J.C. Exigências edáficas da cultura da mandioca. In: SOUZA, L.S.; FARIAS, A.R.N.; MATTOS, P.L.P.; FUKUDA, W.M.G. SOUZA. Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca. cap. 8. Cruz das Almas: **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, p. 70-214, 2006a.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, O. Plant growth-promoting actions of rizobacteria. **Advances in Botanical Research**, v. 51, n. 2, p. 283-320, 2009.

STÜMER, S.L.; SIQUEIRA, J.O. Fungos micorrízicos. In: MOREIRA, F.S.; CARES, J.E.; ZANETTI, R.; STÜMER, S.L. O ecossistema do solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal. Lavras: Ed. **UFLA**. cap. 15, p. 289-310, 2013.

VAN STADEN. J.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, EF. Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonist. In: George1608 Afr. J. Biotechnol. E.F., Hall M., De Klerk G.J. (eds) Plant Propagation by Tissue Culture 3 rd Edition. v.1. **Springer**, Dordrecht, p. 205-226, 2008.

WANG, B.; QUI, Y.L. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. **Mycorrhiza**, v. 16, n. 5, p. 299–363, 2006.

ZHENG, S.; WANG, C.; SHEN, Z.; QUAN, Y.; LIU, X. Role of Extrinsic Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Heavy Metal-Contaminated Wetlands with Various Soil Moisture Levels. **International Journal of Phytoremediation**, v. 17, n. 3, p. 208-214, 2015.

Capítulo I

Acclimatization of inoculated seedlings of *Manihot esculenta* Crantz *in vitro* with plant growth-promoting bacteria

O artigo foi submetido para publicação no periódico Journal of Microbiology

**Acclimatization of inoculated seedlings of *Manihot esculenta* Crantz
in vitro with plant growth-promoting bacteria**

Esmeralda Aparecida Porto Lopes¹, Fábio André Brayner², Luiz Carlos Alves³,
Jadson Emanuel Lopes Antunes⁴, Antônio Dias Santiago⁵, Márcia do Vale
Barreto Figueiredo⁶

^{1,4}Soil Science Graduate Program, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil; ^{2,3}Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brazil; ⁵Embrapa Tabuleiro Costeiro, Maceió, Alagoas, Brazil; ⁶Agronomical Institute of Pernambuco (IPA/SEAGRI), Recife, Pernambuco, Brazil

ABSTRACT - Micropropagation offers important advantages in a vegetative propagated crop, such as cassava, because it allows the elimination of pathogens in infested areas, rejuvenates planting material, recovers the vigor and the productivity and offers in a short time a great quantity of seedlings. The aim of this study was to evaluate the effect of inoculation of plant growth - promoting bacteria (PGPB) in *in vitro* cassava seedlings at the acclimatization phase. The experiment was conducted in a greenhouse. The cultivars studied were "BRA Pretinha III" and "BRS Poti Branca". The PGPB were *Azospirillum Amazon* (BR11140), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175), *Paenibacillus brasiliensis* (24), *Paenibacillus graminis* (MC 0421), *Paenibacillus durus* (V 2232), *Glucanacetobacter diazotrophicus* (BR 11284) and *Streptomyces sp* (S 30). The analysis of electron microscopy showed a satisfactory colonization in roots, with the exception of plants inoculated with bacteria of the genus *Paenibacillus*, which showed a low colonization. The strains used, although not homologous, optimized seedling height, stem diameter, shoot dry matter, root dry matter and accumulated nitrogen, which can provide a greater tolerance to abiotic stresses promoted by plant's transfer from an *in vitro* medium to an *ex vitro* medium. The cultivar "BRS Poti Branca" showed a greater interaction with the strain *Glucanoacetobacter diazotrophicus*. The cultivar "BRA Pretinha III" had more interactions with the strains *G. diazotrophicus*, *Streptomyces sp.*, *H. seropedicae* and *Paenibacillus brasiliensis*. PGPB provided a better performance with "BRA Pretinha III" cultivar in relation to "BRS Poti Branca" cultivar.

Keywords: micropropagation, PGPB, colonization, cultivar, cassava, inoculation.

Corresponding author: Márcia do Vale Barreto Figueiredo, Soil Biology Laboratory, Agronomical Institute of Pernambuco (IPA- SEAGRI), Professor permanent member in the graduate program in Soil Science PPGCS- UFRPE. Recife-PE, Brazil. Av. Gal San Martin, 1371, Bongi - CEP 50761-000 - Recife - PE, Tel. +55 81 31847343; e-mail: mbarreto@elogica.com.br

1. Introduction

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is one of the most explored cultures in world agriculture, occupying about 20 million hectares, with a production of approximately 276 million tons of roots, shared almost entirely by African (57%) Asian (31%) and American (10%) continents (FAO, 2014). The reason for its wide use is due mainly to its ability to adapt to different climate and soil conditions, besides the ease of cultivation and its various uses.

The micropropagation technique has offered significant advantages in a vegetative propagated crop such as cassava because, in addition to recover vigor and productivity, it has also made possible a fast multiplication of a large number of seedlings identical to the mother plant, free of pests and diseases, throughout the year (Pasqual *et al.*, 2014). However, micropropagated plants, due to auxotrophic cultivation, eliminate pathogenic micro-organisms, such as those associated with the plant, making them more susceptible to environmental stresses since some of these microorganisms produce or induce the production of primary and secondary metabolites that may be of a number of benefits to the host plant (Lorentte and Larraburu, 2013).

Among these microorganisms, bacteria play an important role in nutrient cycling. They may be of free-living, associated with plant species or they can even establish a symbiosis with legumes (Figueiredo *et al.*, 2010a). Such bacteria, besides fixing nitrogen (Hoffman *et al.*, 2014), also have other benefits that support, directly or indirectly, plant growth. Thus, they are seen as plant growth -promoting bacteria (PGPB) and can be isolated from several plant species.

Studies with PGPB showed that this biotechnological tool has an important role for survival (Bashan *et al.*, 2014), growth and development of micropropagated plants by suppressing diseases, production and/or altering the concentration of plant hormones, besides increasing efficiency in absorbing nutrients (Vessey, 2003). The present study was performed to evaluate the effect of PGPB strains inoculation in *in vitro* cassava seedlings at the acclimatization stage of micro cassava seedlings.

2. Material and Methods

2.1 Multiplication and preparation of inoculants

For the multiplication and preparation of inoculants, strains of *Azospirillum amazonense* (BR 11140), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175) and *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284) were used. They belonged to the collection of the National Research Center of Agrobiologia (CNPAB, RJ-Brazil), *Streptomyces* sp. (S 30) to the collection of the Federal University of Pernambuco (UFPE, Department of Antibiotics) and *Paenibacillus durus* (V 2232), *Paenibacillus graminis* (MC 0421), *Paenibacillus brasiliensis* (24) to the collection of the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ, Institute of Microbiology). To obtain the inoculants, strains were grown in Erlenmeyer flasks containing culture-specific media. Strains BR 11140, BR 11175 and BR 11284 were grown in the culture medium DYGS (Dextrose Yeast Glucose Sucrose) for 48 hours, whereas for strains MC 0421, 24, V 2232 a TSB culture medium was used (Trypticase soy broth) for 24 or 48 hours according to the bacterial strain. On the other hand, the strain S 30 grew in an AYA culture (Arginine, Yeast and Agar) for 120 hours (all strains were subjected to constant agitation at 200 rpm at 29°C).

2.2 Selection and disinfection of stem cuttings

Stem cuttings of “BRS Poti Branca” and “BRA Pretinha III” were disinfected following instructions by Araújo *et al.*, (2002). The experiment was conducted in a greenhouse and the stem cuttings were planted in trays for germination containing a mixture of substrate + washed sand (1:1), autoclaved at 120°C, 101 KPa, for 1 hour; the pH was adjusted to 6.0 and they were maintained at field capacity until sprouting.

2.3 Isolation of shoots, establishment of apexes and multiplication of cassava plants

The shoots were collected from 15 days after planting (DAP), decontaminated in a laminar flow cabinet according to the method described by Souza *et al.* (2009). The apexes were isolated and established in the nutritive

medium MS (Murashige and Skoog, 1962), supplemented with thiamine-HCl (1 mg/L), inositol (100 mg/L), naphthalene acetic acid (NAA) (0.02 mg/L), benzylaminopurine (BAP) (0.04 mg/L), gibberellic acid (GA3) (0.05 mg/L), sucrose (20 g/L) (ROCA *et al.*, 1991), and agar (8 g/L). The multiplication was conducted according to Souza *et al.* (2009). The plants were kept in a growth chamber under temperature conditions of $26 \pm 1^\circ\text{C}$, artificial light (1948 lux) with a photoperiod of 16 hours.

2.4 PGPB inoculation

In vitro seedlings, when they presented roots and leaves in abundance, were inoculated according to the methodology described by Reis *et al.* (2004), by which each plant received a 2 ml suspension of bacteria, grown in a specific medium, having a bacterial density of $\sim 10^8$ cells.ml⁻¹. In the control treatment (CT), the bacterial suspension was not added. They were then kept in a growth chamber for 10 days at $26 \pm 1^\circ\text{C}$ under artificial light (1948 lux) with a photoperiod of 16 hours. To evaluate the ability to colonize, at 10 days after inoculation root fragments were collected from *in vitro* plants (~ 1 -2 cm length), washed in 0.1M sodium cacodylate buffer, pH 7.4, and then fixed in 0.1 M cacodylate buffer and 2.5% glutaraldehyde (Sigma Aldrich). Post-fixation was performed with osmium tetroxide at 1% (Sigma Aldrich). They were then washed in 0.1 M cacodylate buffer, dehydrated with ethanol and, after obtaining dry matter, a plating coverage of the material by a thin layer of gold was performed for viewing of bacterial isolates on a Scanning Electron Microscopy (SEM).

2.5 Acclimatization

To evaluate the effects of PGPB inoculation in cassava seedlings in the acclimatization phase, an experiment was conducted in a greenhouse at the Headquarters of the Agronomic Institute of Pernambuco - IPA. The soil used was classified as Orthic Carbic Spodosol (EMBRAPA, 2013), with a sandy texture, having the following features in the layer 0-20 cm: pH H₂O: 5.50; 16 mg dm⁻³ of P; 0.06 cmol_c dm⁻³ of K, 1.30 cmol_c dm⁻³ of Ca²⁺; 0.70 cmol_c dm⁻³ of

Mg⁺², 0.15 cmol_c dm⁻³ of Al and 4.63 cmol_c dm⁻³ of H. The substrate had a pH in water of 5.0 +/- 0.5. The recorded temperature and the humidity ranged between 30-32°C and 50-55% during the day, respectively. The plantlets from the cultivation of meristems, after 10 days of inoculation and in a suspension with PGPB, were planted in disposable plastic cups with 0.5 L and 12 cm deep, filled with a mixture of soil + ground substrate at the ratio of 1:1, sterilized at 120°C, 101 KPa, for 1 hour and the pH was adjusted to 6.0. For maintenance of moisture, the plants were covered with a plastic cup (Souza *et al.*, 2009). At 20 DAP, the cups were removed and the plants were fed with a Hoagland and Arnon (1950) solution, modified according to Silveira *et al.*, (1998). Harvest was done at 52 days after inoculation *in vitro* and the following variables were evaluated: bacterial colonization, survival, plant height, root length, stem diameter, shoot dry matter (SDM), root dry matter (RDM), nitrogen accumulated in the shoot (N_{ac}SDM) and SDM/RDM ratio.

2.6 Statistical analysis

The experimental design was a randomized block design, in a factorial design (8 x 2), consisting of seven strains of bacteria, plus 1 control treatment (no bacteria) and two cassava cultivars, with three replications. Each variable studied was subjected to analysis of variance (ANOVA) using the statistical software SISVAR 5.1 Build 72, with significance levels of 5% by F test and the means compared by Tukey test (p<0.05).

3. Results and Discussion

3.1 Cassava micropropagated plant survival to bacterial colonization

The scanning electron microscopy (SEM) enabled to confirm the effectiveness of the bacterial colonization process in cassava seedlings *in vitro*. It was observed that all inoculated strains had the ability to colonize the roots of the two cassava cultivars (Fig. 1 and 2). This is an essential factor for a long-term association, because, according to Bashan and de-Bashan (2005), when PGPB are not associated with epidermal root cells, the metabolites excreted by

the bacteria diffuse in the rhizosphere and are consumed by microorganisms even before bringing benefits to the host.

Generally, strains preferentially colonized the surface of the roots. However, bacterial colonization of internal tissues may not have been confirmed microscopically due to section of cuts and sample preparation, for bacteria of the genus *Azospirillum sp* may be found endophytically, whereas bacteria of the genus *Herbaspirillum sp* and *Gluconacetobacter sp* are mandatory endophytic (Baldani and Baldani, 2005). The PGPB that best colonized the roots when observed in high resolution were *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284), *Azospirillum amazonense* (BR 11140), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175) and *Streptomyces sp.* (S 30), while the seedlings inoculated with strains of the genus *Paenibacillus* (24, V 2232 and MC 0421) did not show this colonizing feature, displaying visually a low colonization in relation to the others (Fig. 1B to 1D and 2B to 2D). Recognition mechanisms of plant-bacteria culminate in adaptation and colonization of plant tissues, which are very specific. This interaction creates a distinction among beneficial symbionts, saprophytic and pathogenic parasites. It is believed that there are subtle differences in plant-bacteria recognition molecules that are controlled by many genes and metabolic pathways, and for one strain, many pathways may be involved in the colonization process, which are influenced by the species of plant, type of soil and environmental conditions (Weller, 2007).

3.2. PGPB inoculation and development of cassava seedlings

After the acclimatization period, the survival rate (Fig. 3) for cv. "BRS Poti Branca" ranged from about 54% to 100%, while for the cv. "BRA Pretinha III" this value ranged from 50% to 96%. The genus *Streptomyces sp* gave the cultivar "BRA Pretinha III" a greater survival rate (96%) if compared to the control (without inoculation), while for the cv. "BRS Poti Branca" the survival rate was 100% for control seedlings. It is common that seedlings transferred to *ex vitro* conditions show a high mortality due to non-functional stomata, underdeveloped root system and leaves not thick or with little or no cuticular wax (Kapoor *et al.*, 2008).

Despite the fact that the genera *A. Amazonas*, *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae* and *Streptomyces sp* do not favor 100% survival for the two cultivars, such results (96% to 83%) correspond to satisfactory survival values, because, according to Huerres and Carballo (1998), a survival rate above 85% is considered good in vivaria. Oliveira *et al.* (2000), studying cassava cuttings from a tissue culture, but without being bacterized, obtained, during the acclimatization period, a 92%, 82% and 95% efficiency, respectively.

On the other hand, inoculation with genres *Paenibacillus* provided the highest mortality rates (33% - 50%), and the lowest survival rates occurred when "BRA Pretinha III" was inoculated with genera *P. graminis* and *P. durus* (Fig. 3). The fact that cassava seedlings from both cultivars did not increase its resistance to supposed biotic and abiotic stresses from the acclimatization period, when inoculated with the genus *Paenibacillus sp*, could be explained by a small plant-bacteria interaction, since this process is complex and may be affected by various biotic and abiotic factors, such as density of the inoculum, host species, cultivar, temperature (Pillay and Novak, 1997), seasonal variations, types of plant tissue (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004), soil type (Fromim *et al.*, 2001), and the interaction with other microorganisms (Figueiredo *et al.*, 2010b).

Considering the root length, at 42 days after planting (Table 1), the PGPB inoculation in seedlings of both cultivars showed no significant differences by the Tukey's test ($p < 0.05$). A research conducted by Mathur *et al.*, (2008) found that micropropagated plants often have small root systems. They indicate a significant difference in cassava's stem diameter ($p < 0.05$) regarding the effects of PGPB in each cultivar. In the cv. "BRA Pretinha III", all PGPB promoted a significant increase in the thickness of the stem diameter when compared to the control treatment (CT). On the other hand, in cv. "BRS Poti Branca", the strains *P. durus*, *P. graminis*, *P. brasiliensis* and *A. amazonense* induced a significant decreased ($p < 0.05$) compared to the control treatment. The thickest stems were observed when seedlings of both cultivars were inoculated with the strain *G. diazotrophicus* (Table 1) with an increase of 53% and 25% for cv. "BRA Pretinha III" and "BRS Poti Branca", respectively. In this sense, it is expected that cuttings with higher neck diameters may lead to plants with more vigorous root systems, favoring survival in the field, initial

development, tolerance to dry summers and high winds and, consequently, increased production (Santos *et al.*, 2004).

With the exception of the strain *P. graminis*, all PGPB significantly stimulated ($p < 0.05$) seedling height (SH) compared to CT in the cultivar "BRA Pretinha III". However, the strains *P. graminis* and *P. brasiliensis* induced a significant decrease ($p < 0.05$) in SH of "BRS Poti Branca". The strains *H. seropedicae* and *G. diazotrophicus* promoted increases of 67% and 19.7% in SH of "BRA Pretinha III" and "BRS Poti Branca", respectively in relation to CT (Table 1). Although the beneficial effects of the inoculation of bacteria in plants and seeds indicate improved nutrition and productivity increase (Naik *et al.*, 2008), deleterious effects were also observed by Probanza *et al.*, (1996), who reported a reduction in the length of shoots and roots, as well as biomass of pine plants (*Pinus taeda* L.), when inoculated with *B. subtilis* (BS1 and BS2). These results support the idea that the ability of PGPB to produce metabolites is not necessarily a prerequisite for the occurrence of an increased growth and production in plants because the beneficial effect depends on its concentration (Saharan and Nehra, 2011).

Regarding the plant-bacteria interaction, considering the seedling height variable, the cultivars showed a significant difference by the Tukey's test ($p < 0.05$) when inoculated with genus *Paenibacillus*. The results showed that inoculation with *P. graminis* and *P. durus* in "BRS Poti Branca" showed a better seedling height development, while with *P. brasiliensis* a greater interaction in "BRA Pretinha III" cultivar (Table 1) occurred. This difference may be related to different photoassimilates produced by each cultivar, which provide specific carbon sources that may contribute to the attraction, retention or inhibition of a microorganism in the rhizosphere region (Valé *et al.*, 2005).

The results presented for the accumulation of shoot dry matter (SDM) (Table 2) indicate a significant difference in cassava's stem diameter ($p < 0.05$) regarding the effects of PGPB in each cultivar. For the cultivar "BRA Pretinha III", the strains *Streptomyces sp* and *H. seropedicae* and *G. diazotrophicus* promoted a significant increase in SDM when compared to the control treatment (CT). *P. graminis* did not differ from CT. On the other hand, *G. diazotrophicus* promoted an increase in SDM in "BRS Poti Branca" cultivar compared to the control treatment, while *P. durus*, *P. graminis* and *P. brasiliensis* did not differ from CT. The strains *Streptomyces sp* and *G. diazotrophicus* promoted an

increase of 200% and 131% in the SDM accumulation in the cultivars "BRA Pretinha III" and "BRS Poti Branca", respectively (Table 2).

In plant-bacteria interaction (Table 2), there was no significant difference ($p < 0.05$) from cassava cultivars in relation to PGPB when inoculated with *Paenibacillus graminis* and *P. brasiliensis* and *G. diazotrophicus*. It was found that the strains *P. graminis* and *G. diazotrophicus* provided a greater benefit in SDM (46% and 32%) when inoculated on "BRS Poti Branca" in relation to "BRA Pretinha III", while the reverse occurred with the strain *P. brasiliensis*, which afforded an increase of 44% compared to the SDM of "BRS Poti Branca" (Table 2). The results corroborate those obtained by Araújo (2008), when it was found that PGPB influence the plants to produce more shoot biomass, and this response is variable according to the plant and/or strain used.

Regarding root dry matter (RDM), the results showed a significant difference ($p < 0.05$) for the effects of PGPB in each cultivar (Table 2). The strain *P. brasiliensis* promoted an increase when inoculated in seedlings of the cultivar "BRA Pretinha III" if compared to CT, while *P. graminis* did not differ statistically from the CT. On the other hand, for the "BRS Poti Branca" cultivar, there was a significant increase ($p < 0.05$) in the production of RDM when inoculated with *G. diazotrophicus*. However, no significant difference between *P. durus* and control (CT) was observed. The strains *P. brasiliensis* and *G. diazotrophicus* promoted an increase of 400% and 200% in the RDM accumulation in the cultivars "BRA Pretinha III" and "BRS Poti Branca", respectively in relation to CT (Table 2).

No significant differences were observed ($p < 0.05$) among PGPB and "BRS Poti Branca" cultivar for the shoot dry matter/root dry matter ratio (SDM/RDM), suggesting that the strains had no influence on this relation at this stage of plant's development. On the other hand, the seedlings of "BRA Pretinha III" cultivar, inoculated with the strain *P. graminis* (4.93 g/plant), were not significantly different by Tukey test ($p < 0.05$) when compared to other bacteria, except in seedlings inoculated with *Streptomyces sp.* (2.47 g/plant) (Table 2).

In this study, the accumulation of SDM in the two cassava cultivars was higher if compared to those found for RDM. According to Alves *et al.*, (2006), the period of the maximum rates of total dry matter accumulation depends on the genotype and growth conditions of the plant. During the growth of cassava, carbohydrates produced by photosynthesis must be distributed to ensure a

good development, both for shoots and roots. However, from 75 DAP, photoassimilates are mainly translocated to the roots. This statement is in agreement with the results of this study, given that the seedlings had a lower accumulation of RDM, resulting thus in higher values in the SDM/RDM ratio.

The positive effects on the accumulation of SDM and RDM by cassava may be associated with the ability that the strains *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Paenibacillus brasiliensis* and *Streptomyces sp* have to fix atmospheric nitrogen and synthesize growth hormones or even a synergistic effect of these two factors (Canuto *et al.*, 2003). Among phytohormones, indole acetic acid (IAA) causes changes in the morphology of roots, influencing the uptake of nutrients and water and hence promoting plant growth (Aguilar-Piedras *et al.*, 2008). Increases in the accumulation of shoot and root dry matter from micropropagated plants were already observed. They may be related to substances that help directly or indirectly plant growth (Moreira *et al.*, 2013). Canuto *et al.* (2003) found a significant increase in accumulation of root dry matter of micropropagated plants of sugarcane when inoculated with *H. seropedicae* and *G. diazotrophicus*. Meguro *et al.*, (2006) observed a rapid emergence and elongation of roots on tissue culture of *Rhododendron* (ornamental plant) inoculated with *Streptomyces sp*. Mello *et al.*, (2002) evaluated the promotion of growth of micropropagated pineapple seedlings and reported an increase in SDM and RDM when inoculated with *Bacillus sp*.

Despite already successfully proven, some strains of *Paenibacillus* promote plant growth (Rodrigues *et al.*, 2013). In this study, strains of *P. durus*, *P. graminis* and *P. brasiliensis*, inoculated in "BRS Poti Branca", did not promote increases in studied variables. Thus, it may be suggested that there was a lesser effect indicative of the plant-bacterium interaction, compromising the mobilization of nutrients and, consequently, the development of the plant.

Table 2 shows the results of the accumulated nitrogen in shoot dry matter (NacSDM), where a significant difference in Tukey test ($p < 0.05$) for the effects of PGPB in each cultivar can be seen. The highest accumulation of NacSDM in "BRA Pretinha III" cultivar was induced by the strains *H. seropedicae* and *G. diazotrophicus*, with values (12.25 mgN/plant) that exceeded three times the accumulated nitrogen in CT (3.88 mgN/plant). On the other hand, the strain *G. diazotrophicus* promoted the highest values (13.42

mgN/plant) when compared to CT (6.26 mgN/plant), while the strains *P. brasiliensis* and *P. durus* did not differ from CT. Regarding PGPB-cultivar interaction, a significant difference ($p < 0.05$) was observed in cassava when inoculated with the strains *P. graminis*, *A. amazonense* and *P. brasiliensis*. The first two strains promoted a higher $N_{ac}SDM$ in "BRS Poti Branca", while in the cultivar "BRA Pretinha III" the inoculation with *P. brasiliensis* produced a higher nitrogen accumulation (Table 2).

The contribution of N in cassava was 114% for the "BRS Poti Branca" and 215% for the cultivar "BRA Pretinha III". These same strains, as previously listed, provided a higher accumulation of SDM and RDM (Table 2). It was found that plant growth is related to the accumulation of nitrogen in the shoot, as shown by the linear relations between shoot dry matter weight and $N_{ac}SDM$ of cultivars "BRA Pretinha III" ($y = 0.0244X - 0.0054$ ($R^2 = 0.949$)) and "BRS Poti Branca" ($y = 0.0289X - 0.0502$ ($R^2 = 0.886$)). For the cv. "BRA Pretinha III", the largest increase of SDM (0.30 g) occurred with an accumulation of N (11.01 mgN/plant), while the largest increase of SDM (0.37 g) in "BRS Poti Branca" occurred with a greater accumulation of N (13.42 mgN/plant). It was found that the interactions cassava-*P. durus* and -*P. graminis* promoted the smallest contributions (20% and 55% of N, respectively).

To Bashan and Levanon (1990), de-Bashan *et al.*, (2012), moderate increases around 20% attributed to inoculation with endophytic diazotrophs would be considered commercially significant in modern agriculture. In this sense, the results are promising and it is essential to know the effects from strains used in this study in experiments in greenhouses and in the field to understand better plant-bacteria-soil interactions.

4. Conclusions

The analysis of scanning electron microscopy showed a satisfactory colonization in roots, with the exception of plants inoculated with bacteria of the genus *Paenibacillus*, which showed a low colonization. The strains used, even though not homologous, optimized seedling height, stem diameter, shoot dry matter, root dry matter and accumulated nitrogen, which may provide a greater tolerance to abiotic stresses promoted by the transfer of the plant from an *in*

vitro medium to an *ex vitro* medium. The "BRS Poti Branca" cultivar showed a greater interaction with the strain *Glucanoacetobacter diazotrophicus*, while the cultivar "BRA Pretinha III" showed a greater interaction with the strains *G. diazotrophicus*, *Streptomyces sp.*, *H. seropedicae* and *Paenibacillus brasiliensis*, promoting increases in seedlings height, shoot dry matter, root dry matter and accumulated nitrogen. The plant growth-promoting bacteria (PGPB) provided a better performance to cultivar "BRA Pretinha III" in relation to "BRS Poti Branca" cultivar for cassava.

5. Acknowledgements

The authors are grateful to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil, to the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Alagoas State University (UNEAL), and to the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA), Brazil, for financial support to research.

6. References

- Aguilar-Piedras, J.J., Xiqui-Vasquez, M.L., Garcia-Garcia, S. and Baca, B. E.** 2008. Indole-acetic acid production in *Azospirillum*. *Rev. Latinoam. Microbio.* **50**, 29-37
- Alves, A.A.C.** 2006. Fisiologia da mandioca. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Embrapa). Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca. Cruz das Almas: *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical*, 138-169.
- Araújo, W.L., Marcon, J., Maccheroni Junior, W., Elsas, J.D. van., Vuurde, J.W.L. van and Azevedo, J.L.** 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interations with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4906-4914.
- Araújo, F.F.** 2008. Rizobactérias e indução de resistência a doenças em plantas. Parte II – Micro-organismos Promotores de Crescimento em Plantas. In: FIGUEIREDO, M. do V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. Micro-organismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura. 1. ed. Guaíba, *Agrolivros*. 197-210.
- Baldani, J.I. and Baldani, V.L.D.** 2005. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. *An. Acad. Bras. Ci.* **77**, 549-579.
- Bashan, Y. and Levanony, H.** 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* **36**, 591-608.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Prabhu, S.R., and Hernandez, J.-P.** 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). (A Marschner Review). *Plant and Soil* **378**,1-33.

- de-Bashan L.E., Hernandez, J. P. and Bashan, Y.** 2012. The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation – A comprehensive evaluation. *Appl Soil Ecol.* **61**, 171-189.
- Bashan, Y. and De-Bashan, L.E.** 2005. Bacteria. In: *Encyclopedia of Soils in the Environment.* **1**, 103-115.
- Canuto, E.L., Salles, J.F., Oliveira, A.L.M., Perin, L., Reis, V.M. and Baldani, J.I.** 2003. Resposta de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. *Agronomia* **37**, 67-72.
- EMBRAPA.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2013. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Brasília: Embrapa Produção de informação; Rio de Janeiro: *Embrapa Solos*, 3ed. 353p.
- FAO. Food and Agriculture Organization** of the United Nations. 2014. Agricultural production: Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.>Acesso dia 20/05/2014.
- Figueiredo, M.V.B., Araújo, A.S.F., Burity, H.A. and Lira Junior, M.A.** 2010a. Biodiversity and potential of PGPR: plant microorganism interactions In: *Microbial Ecology of Tropical Soil ed.* New York : *Nova Science Publishers* **1**, 127-156.
- Figueiredo, M.V.B., Sobral, J.K., Stamford, T.L.M. and Araújo, J.M.** 2010b. Bactérias promotoras do crescimento de plantas: estratégia para uma agricultura sustentável. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; OLIVEIRA, J.P.O.; SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P. *Biotechnology aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais.* Brasília: EMBRAPA Agrobiologia. Parte 4, cap.1, p. 387-414.
- Fromin, N., Achouak, W., Thiery, J. M. and Heulin, T.** 2001. The genotypic diversity of *Pseudomonas brassicacearum* populations isolated from roots of *Arabidopsis thaliana*: influence of plant genotype. *FEMS Microbiol. Ecol.* **37**, 21-29.
- Hoagland, D.R. and Arnon, D. I.** 1950. The water culture method for growing plants without soils. Berkeley: *California Agricultural Experimental Station*, 347p.
- Hoffman, B., Lukoyanov, D., Yang, Z.-Y., Dean, D.R. and Seefeldt, L.** 2014. Mechanism of Nitrogen Fixation by Nitrogenase: The Next Stage. *C. Chem. Rev.* **114**, 4041– 4062.
- Huerres, C. and Carballo, N.** 1998. Cultivo del tomate y pimiento In *Horticulture. Pueblo y Educación.* La Habana, Cuba. p.1-30.
- Kapoor, R., Sharma, D. and Bhatnagar, A.K.** 2008. Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. *Sci Hort*, **116**, 227-239.
- Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W. L., Mendes, R., Geraldi, I. O., Pizzirani-Kleiner, A. A. and Azevedo, J. L.** 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Appl. Environ. Microb.* **6**, 244-1251.
- Llorente, B.E. and Larraburu, E.E.** 2013. *In vitro* propagation of *Fraser photinia* using *Azospirillum*-mediated root development. *Methods Mol. Bio.* **11013**, p. 245-258.
- Mathur, A., Mathur, A.K. and Verma, P.** 2008. Biological hardening and genetic fidelity testing of micro-cloned progeny of *Chlorophytum borivilianum*. *Afr. J. Biotechnol.* **7**, 1046–1053.
- Meguro, A. Y., Ohmura, Y., Hasegawa, S., Shimizu, M., Nishimura, T. and Kunoh, H.** 2006. An endophytic actinomycete, *Streptomyces* sp. MBR-52, that accelerates emergence and elongation of plant adventitious roots. *Actinomycetologica* **1**, 1-9.
- Mello, M.R.F., Mariano, R.L.R., Menezes, M., Câmara, T.R. and Assis, S.M.P.** 2002. Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. *Summa Phytopathol.* **28**, 222-228.

- Moreira, F.S., Nobrega, R.S.A., Fernanda, C. and Silva, K.** 2013b. Bactérias associativas fixadoras de nitrogênio atmosférico. In: MOREIRA, F.S.; CARES, J.E.; ZANETTI, R.; STÜMER, S.L. O ecossistema do solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal. Lavras: Ed. UFLA. cap.18, p.341-350.
- Murashige, T. and Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plan.* **15**, 473-497.
- Naik, B.S., Shashikala, J. and Krishnamurthy, Y.L.** 2008. Host growth characteristics influenced by seed inoculation with microorganisms. *WJAS* **4**, 891-895.
- Oliveira, P.O., Gomes, T.S. and Vilarinhos, A.D.** 2000. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. *PAB* **35**, 2329-2334.
- Pasqual, M., Soares, J.D.R. and Rodrigues, F.A.** 2014. Tissue Culture Applications for the Genetic Improvement of Plants. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. Biotechnology and Plant Breeding: Applications and Approaches for Developing Improved Cultivars, cap. 7, 157-178.
- Pillay, V.K. and J. Nowak.** 1997. Inoculum density, temperature, and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Can. J. Microbiol.* **43**, 354-361.
- Probanza, A., Lucas, J.A., Acero, N. and Manero, F.J.G.** 1996. The influence of native rhizobacteria on European alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) growth. 1. Characterization of growth promoting and growth inhibiting bacterial strains. *Plant and Soil* **182**, 59-66.
- Reis, V.M.** 2004. Método de inoculação de bactérias diazotróficas em plantas de cana-de-açúcar micropropagadas. *Comunidade Técnico Embrapa Agrobiologia*, n.65.
- Roca, W.M., Nolt, B., Mafla, G., Roa, J.C. and Reyes, R.** 1991. Eliminación de virus y propagación de clones en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). In: Roca, W.M. & Mroginski, L.A. *Fundamentos y aplicaciones*, 403-421.
- Rodrigues, A.C., Antunes, J.E.L., Costa, A.F., Oliveira, J.P. and Figueiredo, M. do V.B.** 2013. Interrelationship of *Bradyrhizobium* sp. and Plant Growth-Promoting Bacteria in Cowpea: Survival and Symbiotic Performan. *Journal of Microbiology* DOI 10.1007/s12275-012-2335-7
- Saharan, B.S. and Nehra, V.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria: 2011. A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*, **21**, 1-30.
- Santos, J.A., Silva, C.R.R., Carvalho, J.G. and Nascimento, T.B.** 2004. Efeito do calcário dolomítico e nitrato de potássio no desenvolvimento inicial de mudas da bananeira 'Prata-Anã' (AAB), provenientes de cultura *in vitro*. *Rev. Bras. Fruticultura*. **26**,150-154.
- Silveira, J.A.G., Contado, J.L., Mazza, J.L.M. and Oliveira, J.T.A.** 1998. Phosphoenolpyruvate carboxylase and glutamine synthetase activities in relation to nitrogen fixation in cowpea nodules. *R. Bras. Fisiol. Veget.* **10**, 9-23.
- Souza, A. da S., Junghans, T.G., Souza, F.V.D., Santos-Serejo, J.A. dos., Silva Neto, H.P. da., Menezes, M.C., Silveira, D.G. and Santos, V. da S.** 2009. Micropropagação da mandioca. In: JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A. da S. (Ed.). Aspectos práticos da micropropagação de plantas. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 323-349.
- Valé, M., Nguyen, C., Dambrine, E. and Dupouey, J.L.** 2005. Microbial activity in the rhizosphere soil of six herbaceous species cultivated in a greenhouse is correlated with shoot biomass and root C concentrations. *Soil Biol. Biochem.* **37**, 2329-2333.
- Vessey, K.J.** 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* **255**, 571-586.

Weller, D.M. 2007. *Pseudomonas* Biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. *Phytopathology* **97**, 250-256

Figures

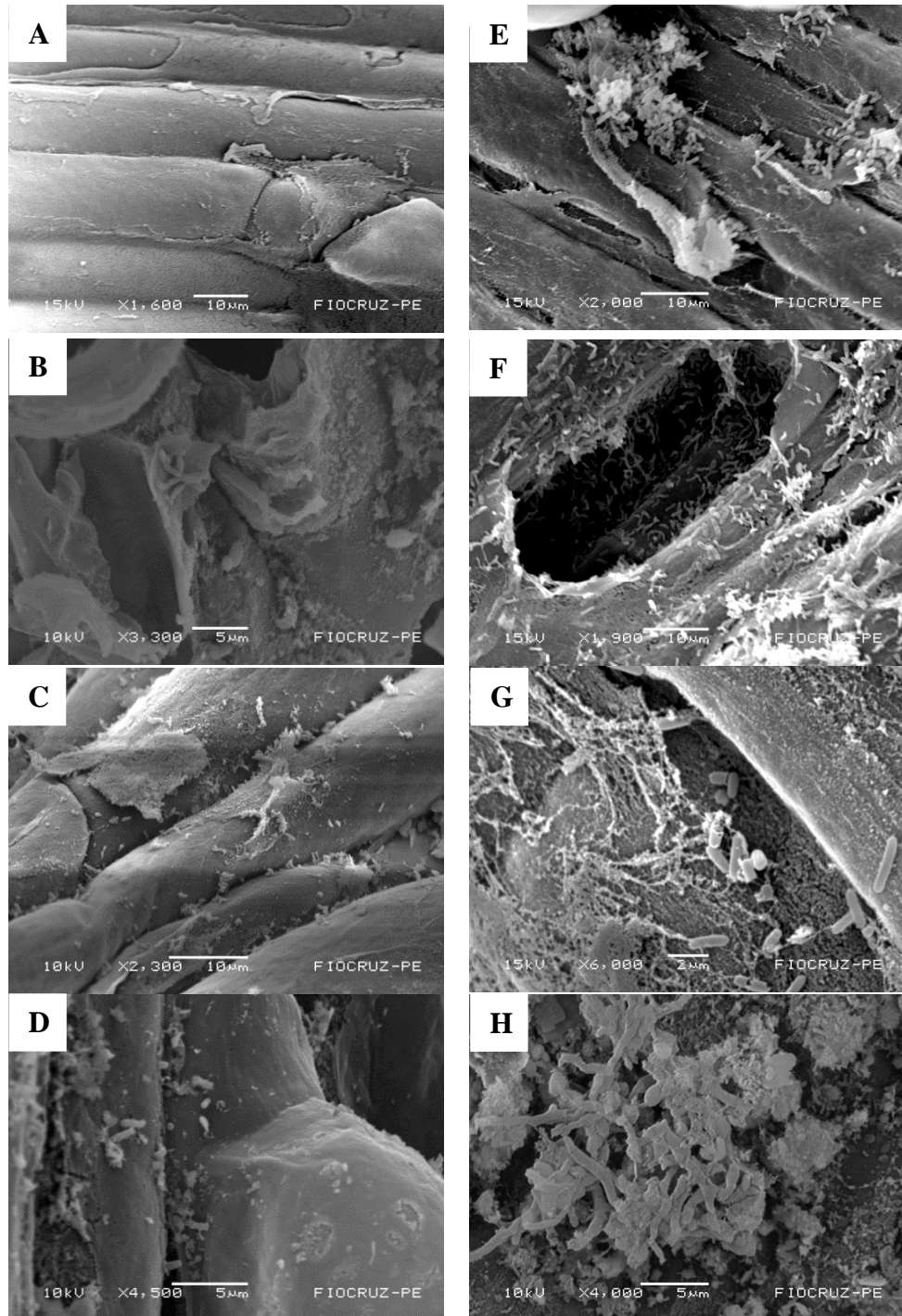


Fig. 1. Images of the root fragments of cassava seedlings of "BRA Pretinha III" cultivar inoculated with (A) control treatment (CT); (B) *Paenibacillus brasiliensis* (24); (C) *Paenibacillus durus* (V 2232); (D) *Paenibacillus graminis* (MC 0421); (E) *Azospirillum amazonense* (BR 11140); (F) *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175); (G) *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284); and (H) *Streptomyces* sp. (S 30) obtained by scanning electron microscopy.

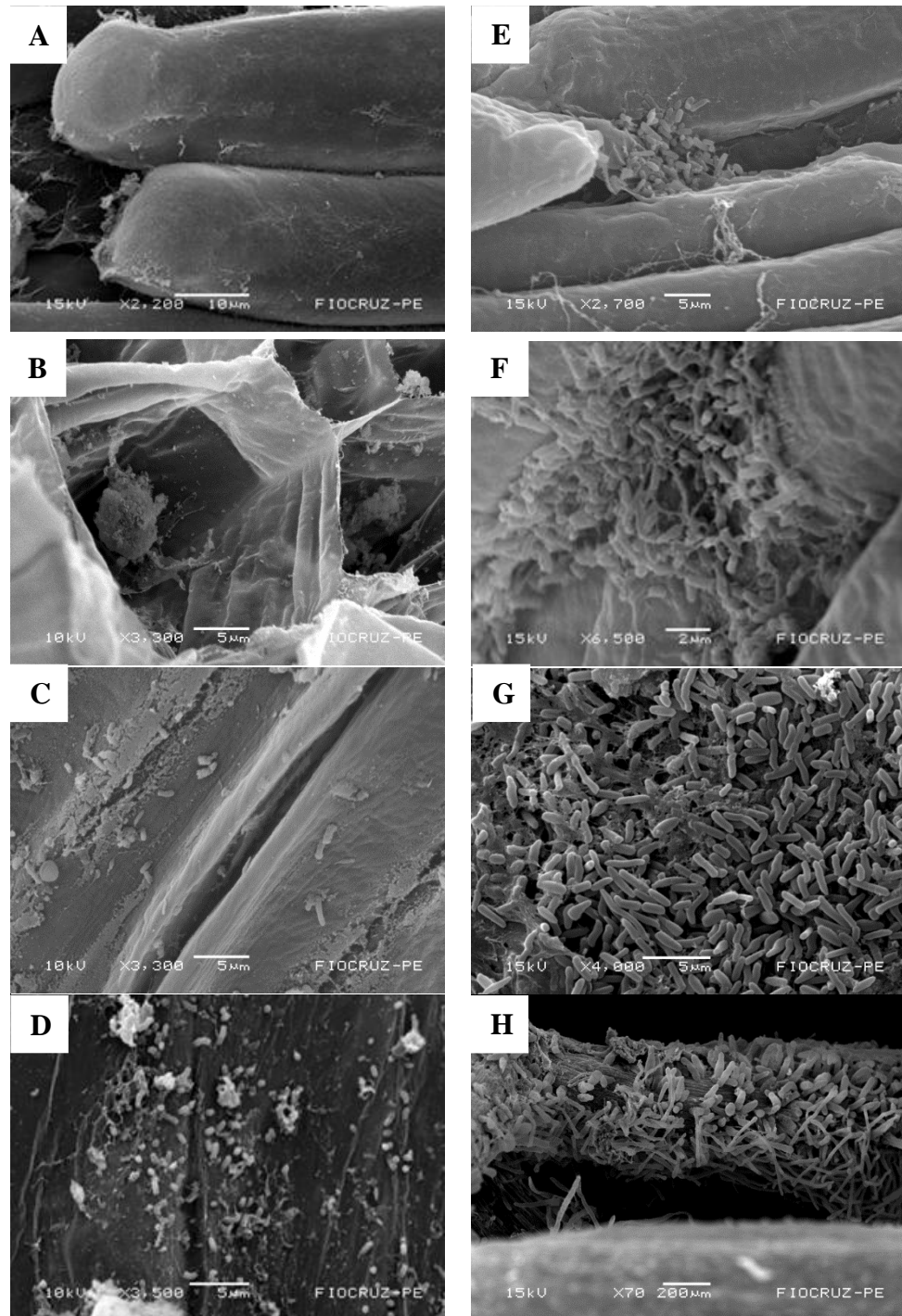


Fig. 2. Images of the root fragments of cassava seedlings of "BRA Poti Branca" cultivar inoculated with (A) control treatment (CT); (B) *Paenibacillus brasiliensis* (24); (C) *Paenibacillus durus* (V 2232); (D) *Paenibacillus graminis* (MC 0421); (E) *Azospirillum amazonense* (BR 11140); (F) *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175); (G) *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284); and (H) *Streptomyces* sp. (S 30) obtained by scanning electron microscopy.

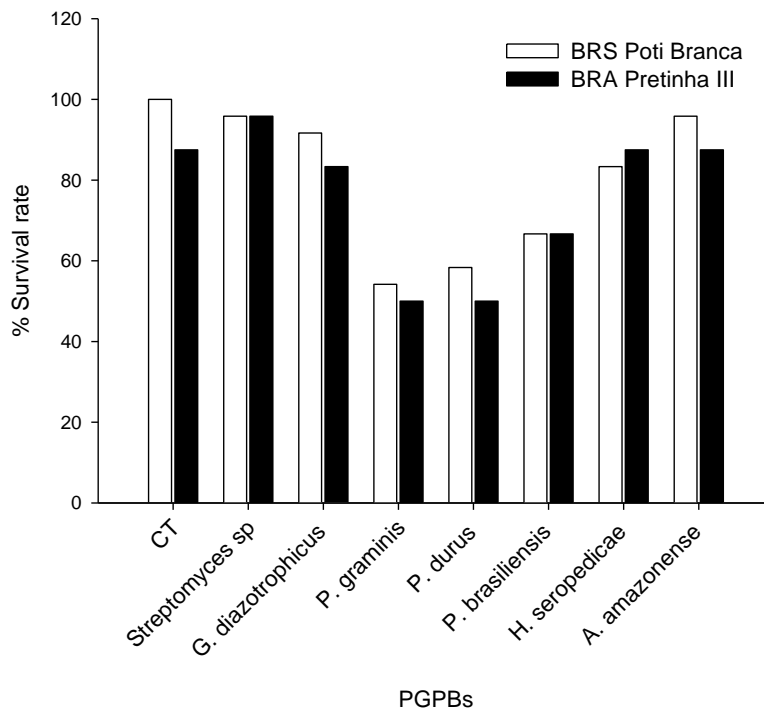


Figure 3. Survival rate of cassava seedlings *Manihot esculenta* Crantz. cv. ("BRS Poti Branca" and "BRA Pretinha III") inoculated with PGPB *Azospirillum amazonense* (BR 11140); *Paenibacillus graminis* (MC 0421); *Paenibacillus durus* (V 2232); *Paenibacillus brasiliensis* (24); *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175); *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284); *Streptomyces sp* (S 30); and control treatment (CT) at 42 days after planting (DAP).

Tables

Table 1. Stem diameter (DS), seedling height (SH) and root length (LR) of cassava plantlets (*Manihot esculenta* Crantz) cv. ("BRS Poti Branca" and "BRA Pretinha III") assessed for inoculation PGPB.

Tratamentos	Cultivars											
	Poti Branca		Pretinha III		Poti Branca		Pretinha III		Poti Branca		Pretinha III	
	DS (mm)		SH (cm)		SH (cm)		SH (cm)		LR (cm)		LR (cm)	
¹ <i>G. diazotrophicus</i>	2.14	aA	1.99	aA	13.17	aA	11.83	abA	14.50	aA	15.83	aA
<i>Streptomyces sp</i>	1.78	abA	1.68	abA	12.33	abA	11.78	abA	14.72	aA	12.72	aA
² <i>H. seropedicae</i>	1.65	abA	1.79	abA	12.11	abA	12.61	aA	12.89	aA	15.11	aA
³ <i>A. amazonense</i>	1.55	bA	1.55	abA	11.28	abA	11.17	abA	15.11	aA	13.78	aA
⁴ <i>P. durus</i>	1.60	bA	1.49	abA	11.28	abA	9.44	bcB	14.72	aA	15.44	aA
<i>P. graminis</i>	1.54	bA	1.49	abA	10.00	bA	8.17	cB	16.16	aA	16.72	aA
<i>P. brasiliensis</i>	1.57	bA	1.81	abA	9.89	bB	11.83	abA	15.53	aA	14.77	aA
CT	1.71	abA	1.30	bB	11.00	abA	7.56	cB	12.00	aA	13.11	aA
Means	1.69		1.64		11.38		10.55		14.45		14.69	
%CV	21.54				16.00				21.28			

Means followed by the same lowercase letter among treatments within the same column, and capital letters among varieties within the same line for each parameter do not differ by Tukey test ($p < 0.05$). ¹ (*Gluconacetobacter* – BR 11284); ² (*Herbaspirillum* – BR 11175); ³ (*Azospirillum* – BR 11140); ⁴ (*Paenibacillus: durus* – V 2232, *graminis* – MC 0421, *brasiliensis* - 24); *Streptomyces* S 30 and CT (control treatment). Means from 3 replications.

Table 2. Shoot dry matter (SDM), root dry matter (RDM), SDM/RDM ratio and nitrogen accumulated in the shoot dry matter ($N_{ac}SDM$) of cassava plantlets (*Manihot esculenta* Crantz) cv. (BRS Poti Branca e BRA Pretinha III) assessed for inoculation with PGPBs.

Tratamentos	Cultivars															
	Poti Branca		Pretinha III		Poti Branca		Pretinha III									
	SDM		RDM		SDM/RDM		$N_{ac}SDM$									
	g		g		$g \cdot g^{-1}$		mg N planta ⁻¹									
¹ <i>G. diazotrophicus</i>	0.37	aA	0.28	aB	0.15	aA	0.12	abcA	2.56	aA	2.70	abA	13.42	aA	12.05	aA
<i>Streptomyces sp</i>	0.30	abA	0.30	aA	0.11	abA	0.13	abA	2.85	aA	2.41	bA	11.57	abA	11.01	abA
² <i>H. seropedicae</i>	0.24	bcA	0.29	aA	0.09	abA	0.10	abcA	2.73	aA	2.84	abA	10.64	abA	12.25	aA
³ <i>A. amazonense</i>	0.25	bcA	0.20	bcA	0.08	abA	0.06	abcA	3.37	aA	3.63	abA	11.44	abA	8.27	abcB
⁴ <i>P. durus</i>	0.17	cA	0.16	bcA	0.05	bA	0.05	bcA	3.68	aA	4.23	abA	7.52	bcA	7.36	bcdA
<i>P. graminis</i>	0.19	cA	0.13	cB	0.07	abA	0.03	cA	3.54	aA	4.93	aA	9.29	abcA	6.03	cdB
<i>P. brasiliensis</i>	0.18	cB	0.26	abA	0.10	abA	0.15	aA	2.83	aA	4.18	abA	8.26	bcA	11.51	abA
CT	0.16	cA	0.10	cA	0.05	bA	0.03	cA	3.73	aA	3.46	abA	6.26	cA	3.88	dA
Means	0,24		0.21		0.87		0,85		3,16		3.55		9,80		9.04	
%CV	31.43				2.89				16.52				16.65			

Means followed by the same lowercase letter between treatments within the same column and capital letter between varieties within the same row for each parameter do not differ at the Tukey test ($p < 0.05$). ¹ (*Gluconacetobacter* – BR 11284), ² (*Herbaspirillum* – BR 11175), ³ (*Azospirillum* – BR 11140), ⁴ (*Paenibacillus: durus* – V 2232, *graminis*– MC 04.21, *brasiliensis* - 24), *Streptomyces* S 30 and CT (control treatment). SDM (shoot dry matter), RDM (root dry matter). For statistical analysis the data on RDM and SDM/RDM were transformed into root of $(x + 1)$. Means of 3 repetitions.

Capítulo II

**Co-inoculation of growth promoting bacteria in plants and *Glomus clarum*
in micropropagated *Manihot esculenta* Crantz**

*O artigo foi submetido para publicação no periódico Journal of Agricultural
Science*

Co-inoculation of growth promoting bacteria in plants and *Glomus clarum* in micropropagated *Manihot esculenta* Crantz

E. A. P. LOPES¹, A. D. A. SILVA², A. C. DO E. S. MERGULHÃO³, M. M. C. MENDES⁴, A. D. SANTIAGO⁵ AND M. V. B. FIGUEIREDO^{6*}

¹*Soil Science Graduate Program, Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), CEP 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^{2,3,4}*Agronomical Institute of Pernambuco (IPA), CEP 50761-000, Recife, Pernambuco, Brazil.*

⁵*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)- Embrapa Tabuleiros Costeiros, CEP 57100-00, Rio Largo, AL, Brazil.*

^{6*}*Agronomical Institute of Pernambuco (IPA/SEAGRI), CEP 50761-000, Recife-PE, Brazil.*

* Agronomical Institute of Pernambuco (IPA), Recife, Pernambuco, Brazil. Av. Gal San Martin, 1371, Bongi - CEP 50761-000 - Recife - PE, Tel. +55 81 31847343; email: mbarreto@elogica.com.br

SUMMARY

Arbuscular mycorrhizal fungi and growth promoting bacteria in plants benefits survival and development of plantlets; such benefits are attributed to the increased absorption of nutrients, improved water absorption, increased tolerance to abiotic stresses, increased photosynthetic rate and greater tolerance to environmental stresses. The aim of this study was to evaluate the co-inoculation of growth promoting bacteria in plants (PGPBs) and *Glomus clarum* in micropropagated *Manihot esculenta* Crantz. The experiment was conducted in the greenhouse. The PGPBs used were *Azospirillum amazonense* (BR 11140), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284) and *Streptomyces sp.* (S 30), and in mixed with double inoculation (*Streptomyces sp* + *A. amazonense*), (*Streptomyces sp* + *H. seropedicae*), (*Streptomyces sp* + *G. diazotrophicus*), (*A. amazonense* + *H. seropedicae*), (*A. amazonense* + *G. diazotrophicus*), (*H. seropedicae* + *G. diazotrophicus*). Strains of PGPBs inoculated in cassava cv. "BRA Pretinha III" influenced mycorrhizal colonization and the number of glomerospores, as occurred synergistic effects of *Glomus clarum* with PGPBs. The crude protein content revealed the contribution of PGPBs in nitrogen nutrition of cassava where the inoculated plants assimilated N in equal proportion with those that received mineral nitrogen. The combined inoculation of PGPBs in the presence of *Glomus clarum* was significant in cassava and foster better performance in plant growth over time, as in all the variables studied, demonstrating binding mycotrophism. Co-inoculation PGPBs and AMF can meet the need of N for cassava, implying reduced use of nitrogen fertilizer.

INTRODUCTION

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is one of the most exploited cultures in world agriculture, occupying about 20 million hectares with a production of approximately

276 million tons of roots, shared almost entirely by African (57%), Asian (31%) and American (10%) continents (FAO 2014).

The reason for its widely diffusion is due mainly to the ability to adapt to different conditions of climate and soil, and the ease of cultivation and mainly due to a higher biological efficiency, converting the greatest amount of solar energy into carbohydrates per unit area (250.10^3 cal/ha/day) than other crops such as corn, rice, sorghum and wheat (Okigbo 1980).

Traditionally, it is one of the staple foods used by man in the tropics and it is estimated that millions of people depend on cassava in Africa, Asia and Latin America, not only as an important buffer against hunger for poor people, but also as generation of employment and income (Olukunle 2013). However, despite the recognized importance in the global socioeconomic scenario, its average yield (13 t/ha) is below its productive potential that, under ideal growing conditions, can reach 80 t/ha/year of roots (El-Sharkawy 2012), and this has been attributed to several factors, including: being grown in soils unsuitable for most crops, adoption of low-tech by the manufacturer, use of low productive potential varieties, shortage of planting material and climatic and/or soil conditions.

Among these factors, the quality of planting material is directly related to the budding and plant vigor and, consequently, the production of roots. Cassava, for presenting a long cycle and being propagated vegetatively, is exposed to many pests and diseases that can be spread over generations, contributing to a significant reduction in yield, in addition to vegetative reproduction system is a direct adverse effect in cassava multiplication rate, given that, in this way, an average of 8 to 12 stakes of a mature plant is obtained with 12 months of life, resulting in low availability of cuttings seed (Mattos *et al.*, 2006).

In this regard, the technique of vegetative propagation *in vitro* enables, in a short time, a large number of identical planting material to the plant matrix and excellent sanitary conditions, allowing the establishment of large-scale plantations (Raaman & Patharajan 2006). However, despite the multiple benefits promoted by this biotechnology in various plant species (trees, forestry and horticulture), the plantlets have less vigor and low performance when transferred from *in vitro* to *ex vitro* conditions (Mello *et al.* 2002), which has hindered the use of this biotechnology in commercial agricultural practices (Kapoor *et al.* 2008). This is due to the sterile and aseptic filling system in which the plants are produced by removing microorganisms that may favor seedlings establishment (Nowak 1998; Panicker *et al.* 2007), since some of these microorganisms produce or induce the production of primary and secondary metabolites that can confer several benefits to the host plants such as increased tolerance to abiotic stresses (Mohammadi *et al.* 2011; Bogino *et al.* 2013), growth promotion (Ortas *et al.* 2011; Rodrigues *et al.* 2013; Sharma *et al.* 2014) and the biological control of plant pathogens (Varma *et al.* 2012; Liu *et al.* 2014).

However, studies have shown that microbial interactions between bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) have benefits that facilitate both the improvement of soil fertility (Tristão *et al.* 2006) as also stimulating sanity (Sayeed & Siddiqui 2008) and plant nutrition (Wang *et al.* 2011), promoting plant growth (Arthurson *et al.* 2011). These benefits were attributed to the increase in germination rate and AMF growth (Xavier & Germida 2003) promoted by PGPBs, stimulating greater mycorrhizal colonization in the root (Jaderlund *et al.* 2008), and consequently greater absorption of water and nutrients. On the other hand, exudates from the hyphae of AMF can stimulate bacterial growth and also change the structure of bacterial communities.

Knowing that when plantlets established *ex vitro* have lower survival rates and low growth, and that the combined use of microorganisms is an aspect little studied in cassava seedlings, the hypothesis is that the interaction of growth promoting bacteria in plants (PGPBs) and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* in cassava plants micropropagated in "BRA Pretinha III" cultivar can optimize growth, vigor and plant health, with likely increase in the survival rate. Different PGPBs inoculated alone and in combination were evaluated and different biological and physiological parameters were analyzed in this study.

MATERIAL AND METHODS

Multiplication and preparation of bacterial inoculants

For multiplication and preparation of inoculants were used strains *Azospirillum amazonense* (BR 11140), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175) and *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284) from the collection of the National Research Center for Agrobiolgy (CNPAB, RJ-Brazil) and *Streptomyces sp.* (S 30) from the collection of the Federal University of Pernambuco (UFPE, Department of Antibiotics). To obtain the inoculant, strains were grown in Erlenmeyer flasks containing specific culture media. Strains BR 11140, BR 11175 and BR 11284 were grown in DYGS culture medium (Dextrose Yeast Glucose Sucrose) for 48 hours, while the S 30 strain was grown in ALA culture medium (arginine, and yeast agar) for 120 hours. All strains were kept in agitation 200 rpm and 29 °C.

Multiplication of Glomus clarum

The isolate from AMF *Glomus clarum* (Nicolson & Schenck 1979) was used, multiplied in greenhouse in cultivation pots with a capacity of 3.0 kg soil/pot, containing a mixture of soil (Spodosol): vermiculite (2:1 v/v) previously autoclaved at 120 °C, 101 kPa, for 1 hour and three consecutive days, with millet as the host plant

(*Panicum miliaceum* L.). After the multiplication, the inoculum produced was rated as the number of glomerospores employing tailing techniques and wet sieving (Gerdemann & Nicolson 1963), and complemented by centrifugation technique and sucrose flotation (50%) (Jenkins 1964). The spore count was performed on grooved plates under stereoscopic microscope (40x).

Selection and disinfection of cuttings

Cuttings of cultivar "BRA Pretinha III" were used; cataloged in Germplasm Bank of Itapirema Experimental Station - IPA/Goiás/Pernambuco, which were sterilized according to Araújo *et al.* (2002). The experiment was conducted in a greenhouse, and the cuttings were planted in trays for germination containing a mixture of commercial substrate + washed sand (1:1), autoclaved at 120 °C, 101 kPa for 1 hour; pH was adjusted to 6.0 and maintained in the pot until the sprouting.

Isolation of shoots, establishment of stem apices and multiplication of cassava plants

Shoots were collected from 15 days after planting (DAP), decontaminated under laminar flow chamber according to the method described by Souza *et al.* (2009). The apices were isolated and established in the MS medium (Murashige & Skoog 1962) supplemented with thiamine-HCl (1 mg/l), inositol (100 mg/l), naphthaleneacetic acid (NAA) (0.02 mg/l), benzylaminopurine (BAP) (0.04 mg/l), gibberellic acid (GA3) (0.05 mg/l), sucrose (20 g/l) (Roca *et al.*, 1991), agar (8 g/l). The multiplication was conducted when seedlings have reached 10 cm length, which were sectioned into several micropiles and then placed in fresh MS medium with the same basic medium composition for the establishment of apices, varying only in the concentration of NAA BAP and GA3 regulators, which are now all 0.01mg/l. In both stages, establishment and multiplication, pH was adjusted to 5.7 and seedlings were kept in a growth chamber

under conditions of temperature of 26 ± 1 °C, artificial light (1948 lux) and 16 hours photoperiod (Souza *et al.*, 2009).

Inoculation of PGPBs and acclimatization

The plantlets *in vitro* were individualized when presenting roots and leaves in abundance, their roots washed with autoclaved distilled water, part of their roots were cut (2 cm) and then transferred to test tubes with modified MS culture medium (without hormones, with the concentration of sucrose and nutrients and 10 times reduced and no agar) according to the methodology of Reis (2004). They were then inoculated with a bacterial suspension grown in a specific medium, with $\sim 10^8$ cells/ml bacterial density. For treatments with individual strains, the roots were inoculated with a 2 ml suspension, whereas those with double inoculation of strains, roots were inoculated with 1 ml of each strain. In the control treatment (CT) was not added bacterial suspension. Seedlings were kept in a growth room at 26 ± 1 °C under artificial light (1948 lux) and 16h photoperiod.

After 10 days, seedlings were planted in 0.5 l disposable plastic cups filled with a soil autoclaved mixture of Spodosol + commercial substrate at 1:1 ratio (pH 6.0) and acclimatized in a greenhouse at the Agronomic Institute of Pernambuco Headquarters - Recife-Brazil IPA. In the treatments with AMF was determined the rate 1.40 g of propagules, containing approximately 200 glomerospores. Each seedling was covered with white plastic cup for maintenance of moisture, as described by Souza *et al.* (2009). After 20 days of planting, coverage cups were destroyed and seedlings were fed weekly on Hoagland & Arnon solution (1950), free of P and N, as Jarstfer & Sylvia (1992) and Silveira *et al.* (1998) for a period of over 34 days.

Transplant to pots

From 34 DAP, plants were transplanted in vessels with capacity of 8 kg of soil/pot (Orthic Duric Spodosol) previously fertilized, according to the soil chemical analysis that showed the following properties in the layer (0-20 cm): $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ 5.50; 16 mg/dm^3 P; 0.06 cmolc/dm^3 K, 1.30 cmolc/dm^3 Ca^{2+} ; 0.70 cmolc/dm^3 Mg^{+2} , 0.15 cmolc/dm^3 Al and 4.63 cmolc/dm^3 H with sandy texture (EMBRAPA 2009). All treatments received 1.5 t / ha CaCO_3 67 kg K/ha as KCl, and the nitrogen control (NC) received 71 kg N/ha as $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Weekly was applied Hoagland & Arnon (1950) solution, free of P and N was applied according to Jarstfer & Sylvia (1992) and Silveira *et al.* (1998). The humidity was maintained in the pot capacity.

Harvest was carried out at 66 days after transplanting and the following variables were evaluated: plant height (PH), root length (RL), stem diameter (SD), shoot dry matter (SDM), root dry matter (RDM), nitrogen accumulated in the SDM (N_{acSDM}) (determined by the Kjeldahl method by EMBRAPA (2009), shoot dry matter / root dry matter ratio (SDM/RDM), P content in the shoot (Watanabe & Olsen 1965). The number of glomerospores was evaluated by counting using the aforementioned techniques, roots colonization (Phillips & Hayman 1970). The response to mycorrhizal colonization was calculated using the formula $\text{RM} = \text{TDM}$ (total dry matter) and mycorrhizae - TDM without mycorrhiza / TDM with mycorrhiza x 100 (Plenchette *et al.* 1983) and crude protein ($\text{CP} = \% \text{N} \times 6.25$).

Statistical analysis

The experimental design was a randomized block design at 12 x 2 factorial arrangement (inoculation of 4 individual strains and 6 in mixture + 2 controls: absolute and nitrogen (CT, CN) with and without AMF (*Glomus clarum*), with 3 repetitions. The PGPBs included: *Azospirillum amazonense* (BR 11140), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284) and *Streptomyces sp.* (S

30), and mixed with double inoculation (*Streptomyces sp* + *A. amazonense*), (*Streptomyces sp* + *H. seropedicae*), (*Streptomyces sp* + *G. diazotrophicus*), (*A. amazonense* + *H. seropedicae*), (*A. amazonense* + *G. diazotrophicus*), (*H. seropedicae* + *G. diazotrophicus*). Each variable studied was subjected to analysis of variance (ANOVA) using the statistical program SISVAR 5.1 Build 72 (Ferreira 2007), with at 5% significance by F test and means compared by the Tukey test ($P < 0.05$).

RESULTS

It was found significant difference in the variable mycorrhizal colonization by the Tukey test ($P < 0.05$) compared with PGPBs strains. The S 30 + BR 11140 treatment (*Streptomyces sp* + *Azospirillum amazonense*) had low colonization compared to the double inoculation with strains BR 11140 + BR 11284 (*Azospirillum amazonense* + *Gluconcetaobacter diazotrophicus*) and S 30 + BR 11284 (*Streptomyces sp.* + *Gluconcetaobacter diazotrophicus*), which promote around 50% and 44% increase in the colonization compared to S30 + BR 11140. Despite the increase in mycorrhizal colonization by PGPBs, it was usually observed that they did not differ statistically ($P < 0.05$) from the control (CT + AMF) when inoculated with *Glomus clarum*. Only double inoculation with BR 11140 + BR 11284 showed growth trend of around 10% in the colonization compared with CT + AMF.

Regarding the number of glomerospores, significant differences were detected ($P < 0.05$) according to the PGPBs inoculation (Table 1). The highest number of spores of *G. clarum* occurred in the absence of PGPBs (CT+ AMF); however, the CT + AMF did not differ statistically from most PGPBs, except for the inoculation with both BR 11140 + BR 11175 (*A. amazonense* + *Herbaspirillum seropedicae*) and BR 11284 + BR 11175 (*G. diazotrophicus* + *Herbaspirillum seropedicae*), which showed decreases of 851% and 267% compared to CT + AMF, respectively.

In the variable root length (Figure 1), there was no significant difference in PGPBs when analyzed individually in the presence and absence of AMF by the Tukey test ($P < 0.05$). However, there was significant interaction ($P < 0.05$) by Tukey test when the *G. clarum* was inoculated with the BR 11140 (*A. amazonense*), BR 11284 (*G. diazotrophicus*) and when co-inoculated with S30 + BR 11284 (*Streptomyces sp.* + *G. diazotrophicus*) and S30 + BR 11175 (*Streptomyces sp.* + *Herbaspirillum seropedicae*), a fact that stimulated root growth in 93%, 48% and 46% over those plants not inoculated.

Regarding the stem diameter, there was no significant interaction by Tukey test ($P < 0.05$) between PGPBs x AMF when assessed at 49 and 100 days after planting (DAP); however, it was significant at 65 and 84 DAP (Table 2). The highest stem thickness was found when the plant was inoculated with BR 11140 (*A. amazonense*) (65 DAP) and double inoculation S30 + BR 11140 (*Streptomyces sp.* + *A. amazonense*) (84 DAP), with increments of 40% and 33.6% when compared to nitrogen control (CN). Regression equations (Figure 2) showed that stem diameter increased linearly both in the presence ($R^2 = 0.95$) and absence ($R^2 = 0.99$) of AMF; however, when the plant was inoculated with *G. clarum*, the stem thickness at 51 days increased 3.25 mm, while it was only 0.58 mm when in the absence of fungus.

There was no interaction between PGPBs x AMF for plant height in the evaluated times (49, 65, 84 and 100 DAP) by the Tukey test ($P < 0.05$) (Table 3); but the plant height increased linearly both in the presence ($R^2 = 0.99$) and in the absence of the fungus ($R^2 = 0.99$), obtaining greater benefits when inoculated with *G. clarum*, considering that grown 16.23 cm in 51 days, while in the absence of the fungus only 3.25 cm (Figure 3).

In the root dry matter accumulation (RDM), shoot dry matter (SDM) and SDM/RDM ratio, the PGPBs, when co-inoculated with *G. clarum* or in its absence, did not differ statistically by Tukey test ($P < 0.05$), but all the plants accumulated more RDM, SDM and had a higher SDM/RDM ratio when in the presence of mycorrhizal fungi ($P < 0.05$). In isolated inoculation of AMF (CT), there were increases of 1.104% in the root and 1.273% in the shoot. Despite not having been shown a different effect depending of AMF depending on PGPBs, cassava plants inoculated with *H. seropedicae* (BR 11175) showed increments of 3.340% in shoots and 3.700% in roots (Table 4). It was found that the cultivar "BRA Pretinha III" is highly responsive to AMF, considering its 92% response to mycorrhizal colonization (CM) that is, the possibility of this group grows without *G. clarum* and under this soil fertility conditions was 8%.

There were no significant differences by Tukey test ($P < 0.05$) in the nitrogen accumulated in the shoot dry matter (N_{acSDM}) and root dry matter (N_{acRDM}) in cv. "BRA Pretinha III" (Table 4) when PGPBs were co-inoculated or not with *G. clarum* ($P < 0.05$); however, all treatments with the AMF for both variables were higher than those without fungi ($P < 0.05$), showing increases of around 1.605% and 892% in the accumulation of nitrogen (N) in both the SDM and RDM, as compared to control (without *G. clarum*), respectively. Although there has been no difference in these variables, interaction with *G. clarum* promoted N accumulation around 3.025% and 2.267% on SDM and RDM, respectively, when co-inoculated with BR 11175 (*H. seropedicae*).

In variable crude protein (CP) (Table 5) in the absence of *G. clarum*, PGPBs were statistically different by the Tukey test ($P < 0.05$). BR 11175 (*H. seropedicae*) favored increases of 48% and 43.7% in the cassava shoot crude protein content compared to the double inoculation S 30 + BR 11284 (*Streptomyces sp* +

Gluconacetobacter diazotrophicus) and CT (absolute control); furthermore, this strain increased CP content in 20.7% ($P < 0.05$), compared to the same co-inoculated treatment with the AMF. It can also be seen that in plants free of inoculation with *Glomus clarum* (CT and the double inoculation S 30 + BR 11284) PB cassava percentages were reduced.

The phosphorus (P) content in the shoot dry matter (PSDM) did not differ statistically at the level of $P < 0.05$ when plants were inoculated with the PGPBs and co-inoculated with *G. clarum* (Table 5). The lack of results for plants not inoculated with AMF occurred because they do not contain sufficient biomass for match analysis (P) in SDM.

DISCUSSION

This study has shown that roots usually had high mycorrhizal colonization, and this may be related to the high degree of mycotrophism of cassava especially in the early stages of growth, which has undeveloped radicular system. However, many other factors can also influence the mycorrhizal colonization, such as soil chemical and physical properties, environmental conditions, but also aspects inherent to the plant, such as health and phenology (Colozzi & Nogueira 2007). The percentage of mycorrhizal colonization in cassava plants from the meristem cultivation in a greenhouse has been reported ranging from 62.8% to 69.8% when not inoculated with PGPBs (Correa *et al.* 1992) and 65.4% to 89.8% when co-inoculated with PGPBs (Balota *et al.* 1997) confirming the results of this work. Despite the increased root colonization by PGPBs, only the double inoculation with BR 11140 + BR 11284 showed a trend towards an increase of 10% in colonization, when compared to CT + *G. clarum*.

During the free-living phase, the AMF may interact with specific bacterial populations and increase from 1.2 to 17.5 times the establishment of mycorrhizae in plant roots (Frey-Klett *et al.* 2007); in addition, bacterial proliferation before symbiosis can also promote the growth of fungus on its saprophytic state at soil or root surface, causing or accelerating germination of fungal propagules in the soil (Garbaye 1994; Xavier & Germida 2003). However, little stimulation of PGPBs on mycorrhizal colonization was observed when compared to CT + *G. clarum*, and this may be related to the competition between bacteria and fungi for photoassimilates produced by plants (Mortimer *et al.* 2008). In addition, the existence of a microorganism in a particular time and place results of its evolution, the existence of favorable or unfavorable abiotic factors for its development (Moreira & Siqueira 2002). Among these factors, flavonoids synthesized by plants seem to affect the germination of AMF spores and their growth (Nair *et al.* 1991; Kape *et al.* 1993).

Regarding the number of glomerospores, PGPBs usually had no effect on sporulation of *G. clarum*; however, the double inoculations with strains *Azospirillum amazonense* + *Herbaspirillum seropedicae* and *Gluconacetobacter diazotrophicus* + *H. seropedicae* promoted inhibition on spore formation process when compared to the control (with *G. clarum* only). Despite synergistic effects between AMF and PGPBs having been reported by Dai *et al.* (2008), Ruíz-Sánchez *et al.* 2011), little is known about the effect of rhizospheric microorganisms on arbuscular mycorrhiza formation; however, they are determining to the densities and activities of populations in the rhizospheric microbial community, both bacterial inoculants can exert influence on mycorrhizal colonization (Johansson *et al.* 2004), as the AMF on the soil microbial community (Dantas *et al.* 2009), such effects may be related to the production of compounds that inhibit or stimulate some microbial groups such as: amino acids, plant

hormones, vitamins and other organic compounds (Riedlinger *et al.* 2006; Kai *et al.* 2009; Reis *et al.* 2010).

As for the promotion of plant growth, root morphology effects such as increase in length, the number of branches or even root hairs have been already reported in plants when colonized by PGPBs (Roesch *et al.* 2005), which are generally associated with the production phytohormones. However, in this study, exudates released by the roots, which are extremely diverse, probably promoted a greater plant-fungus-bacterium synergism when *G. clarum* was co-inoculated with the strains *A. amazonense*, *G. diazotrophicus* and as well as the doubles inoculation *Streptomyces sp.* + *G. diazotrophicus* and *Streptomyces sp.* + *H. seropedicae*, favoring a larger increase in the roots, such responses can vary considerably in quantity and quality, depending on numerous factors, such as: plant species, fungus species, bacterial strains, age and vigor of plants, soil type and environmental factors such as light, temperature and humidity (Miranda 2008). It is suggested, therefore, that combinations of microorganisms described above, inoculated in cassava is its early growth for promoting further growth in roots may promote greater extraction of nutrients from deeper environments, but also a higher water uptake, optimizing its production potential.

Both the thickness of the stem diameter (SD), as in plant height (PH), and shoot dry matter accumulation (SDM), root dry matter (RDM) and SDR/MSR ratio, synergistic responses between *G. clarum* and PGPBs were not observed, though results were much higher for biomass (SDM and RDM) than those found by Balota *et al.* (1997), who observed increases of 555% and 1,979% on SDM and RDM, respectively, when evaluated cassava plants micropropagated at 95 days after planting, inoculated only with *G. clarum*. The lack of synergistic responses between PGPBs and AMF were also observed by Lima *et al.* (2011) in which strains of *Stenotrophomonas maltophilia*

and *Azospirillum* sp. combined with *G. clarum* and *Gigaspora margarita* did not promote stimulatory or suppressive effects on the growth of papaya seedlings; however, inoculation with AMF increased significantly in the growth.

The results clearly demonstrate the symbiotic effectiveness of *G. clarum* under studied conditions, whereas without its nutritional benefits, plants were greatly reduced when grown on sterilized soil. Such benefits are the result of complex and dynamic interactions between roots and mycelium modulated by the environment, which allows the expansion of nutrient absorption capacity on the part of autotrophic symbionts and hence their interspecific competitiveness and productivity (Moreira *et al.* 2010).

The effect of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth is especially significant with respect to the low mobility of nutrients in the soil, which practically do not move through mass flow but reach the roots by means of diffusion mechanisms (Marschner 1995) such as the macronutrient phosphorus (P) and micronutrients as zinc and copper (Cardoso *et al.* 2010). However, in this study, despite not having been observed synergistic responses between *G. clarum* e PGPBs as the accumulation of nitrogen (N) in the shoot dry matter (N_{acSDM}) and root dry matter (N_{acRDM}), the presence of *G. clarum* released more nitrogen to plants compared to those non-inoculated, which may have been attributed to increased absorption surface and consequently the exploited soil volume (Cuenca & Azcón 1994), but also the type of fertilizer used (ammonium sulfate), which is less mobile than N as nitrate, which may have favored greater absorption and translocation in mycorrhizal plants (George *et al.* 1992; Cuenca & Azcón 1994).

This result is promising and it would be highly recommend to producers. Several studies show the *Glomus* efficiency by increasing the N content in plants. Balota *et al.* (1997) demonstrated that treatment with *G. clarum* favored a higher nitrogen

accumulation in micropropagated cassava plants than those inoculated with the PGPBs and control (without AMF), confirming the results of this work. Sala *et al.* (2007) obtained higher growth, accumulation and utilization of N and P by wheat plants when inoculated with *Glomus*.

Through determination of crude protein (CP), it was found that PGPBs contributed to cassava's nitrogen nutrition, considering that plants usually had higher CP concentration than the absolute control, and were not different from nitrogen control, suggesting that the inoculated plants settled and assimilated nitrogen in the same proportion to those that received the dose of 71 kg N/ha. The study also showed that the strain *Herbaspirillum seropedicae* was the most efficient in the use of atmospheric N compared to absolute control. The reasons that lead to variation of BNF response in cassava has not been fully elucidated, suggesting that the interaction between genotype and environment has a significant influence on the efficiency of diazotrophic organisms (Gyaneshwar *et al.* 2002).

In this sense, under the studied conditions, it is suggested that the N addition becomes unnecessary, which would explain the great versatility of this crop production in low fertility soils. This feature highlights the importance of associating microorganisms in cassava crops because they play important role in its establishment and maintenance (Balota *et al.* 1997), as well as the selection of cassava varieties that undergo a process of adaptation to the environment to then expose all its vigor (Pessoa 2009).

Regarding the accumulation of phosphorus (P) in the SDM, the results of this study corroborate those observed by Balota *et al.* (1997), who found that PGPBs did not influence the P accumulation in shoots of micropropagated cassava plants in the presence of *G. clarum* when evaluated at 95 days after planting. The average

accumulation of 3.14 g/kg P dry matter in this study was close to those analyzed by the same author (2.64 g/kg dry mass). Likewise, Lima *et al.* (2011) evaluated the PGPBs x AMF interaction in papaya seedlings and concluded that PGPBs did not influence the P content in the dry matter of shoots. However, despite this macronutrient being extracted by cassava in lower quantities, it was observed that plants showed restrictions in its development in the absence of *G. clarum*, and this can be related to limitations in the P availability, since, according to Grant *et al.* (2001), P deficiency symptoms include reduced plant height, delay in the emergence of leaves and sprouting, and reduced development of secondary roots and dry matter production.

Despite P availability in the soil being the most important factor in edaphic intraradicular fungal growth, as it affects the root exudation, whose components may be important for fungal nutrition and, or, in molecular signaling during pre-infection processes and colonization (Saggin Junior & Silva 2002); the benefits promoted by *G. clarum* in cv. "BRA Pretinha III" were demonstrated by P content in the soil of 16 mg/dm³, corroborating Howeler *et al.* (1982), when noted that the available P level required to obtain 95% of maximum production amounted to approximately 15 mg/dm³ in mycorrhizal plants, and 190 mg/dm³ in those non-inoculated. As for Kato (1987) and Balota *et al.* (1997), the significant increase in dry matter of cassava depending on the AMF inoculation occurred due to soil P contents be at the critical limit for cassava development (8 to 10 mg/dm³), results that support investments to enhance this technology and consolidate the use of inoculants in the cassava crop.

In this sense, strains of growth promoting bacteria in plants (PGPBs) inoculated in cassava cv. "BRA Pretinha III" influenced mycorrhizal colonization and the number of glomerospores. The combined inoculation PGPBs in the presence of *G. clarum* in cv. "BRA Pretinha III" promoted improved growth performance of plants over time,

demonstrating binding mycotrophism. The crude protein content revealed contribution of PGPBs in nitrogen nutrition of cassava where the inoculated plants assimilated N in equal proportion to those that received mineral nitrogen. Summarizing the co-inoculation PGPBs and *G. clarum* can meet the N need for cassava, implying reduced use of nitrogen fertilizer, suggesting reducing costs and contributing to a more sustainable agriculture.

CONCLUSIONS

The strains of PGPBs inoculated to cassava cv. “BRA Pretinha III” influenced mycorrhizal colonization and the number of glomerospores, as occurred synergistic effects of *Glomus clarum* with PGPBs. The crude protein content revealed the contribution of PGPBs in nitrogen nutrition of cassava where the inoculated plants assimilated N in equal proportion with those that received mineral N. The combined inoculation of PGPBs in the presence of *G. clarum* was significant in cassava and foster better performance in plant growth over time, as in all the variables studied, demonstrating obligatory mycotrophism. Co-inoculation of PGPBs and FMA can meet the need of N for cassava, implying reduced use of nitrogen fertilizer.

REFERENCES

- ARAÚJO, W.L., MARCON, J., MACCHERONI JUNIOR, W., ELSAS, J.D. VAN., VUURDE, J.W.L. VAN & AZEVEDO, J.L. (2002). Diversity of endophytic bacterial populations and their interations with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 4906-4914.
- ARTHURSON, V., HJORT, K., MULETA, D., JADERLUND, L. & GRANHALL, U. (2011). Effects on *Glomus mosseae* root colonization by *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus brasilensis* strains as related to soil P-availability in winter wheat. *Applied and Environmental Soil Science* **2011**,1-9.
- CUENCA, G. & AZCÓN, R. (1994). Effects of ammonium and nitrate on the growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal *Erythrina poeppigiana* OI Cook seedlings. *Biology and fertility of soils* **18**, 249-254.

BALOTA, E.L., LOPES, E.S., HUNGRIA, M. & DÖBEREINER, J. (1997). Inoculação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos-arbusculares na cultura da mandioca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **32**, 627-639.

BOGINO, P., ABOD, A., NIEVAS, F. & GIORDANO, W. (2013). Water-Limiting Conditions Alter the Structure and Biofilm-Forming Ability of Bacterial Multispecies Communities in the Alfalfa Rhizosphere. *PLoS ONE* **8**, e79614.

CARDOSO, E.J.B.N., CARDOSO, I.M., NOGUEIRA, M.A., BARRETA, C.R.D.M. & de PAULA, A.M. 2010. Micorrizas Arbusculares na aquisição de nutrientes pelas plantas. In: SIQUEIRA, J.O., de SOUZA, F.A., CARDOSO, E.J.B.N. & TSAI, S.M. Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil. Lavras: *Ufla*, 716 p.

COLOZZI FILHO, A. & NOGUEIRA, M. A. (2007). Micorrizas arbusculares em plantas tropicais: café, mandioca e cana-de-açúcar. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. (Ed.). Microbiota do solo e qualidade ambiental. Campinas: *Instituto Agrônomo*, 312 p.

CORREA, N.DEJ.C., PINTO, C.A.B.P. & OLIVEIRA, E.DE. (1992). Comportamento de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em presença do fungo micorrizico *Glomus clarum* Nicolson & Schenck e dosagens de fosforo. *Ciencia e Pratica* **16**, 467.

DAI, M., WANG, H.-X., YIN, Y.-Y., WU, X., WANG, M.-Y. & LIU, R.-J. (2008). Effects and mechanisms of interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria. *Shengtai Xuebao/Acta Ecologica Sinica* **28**, 2854-2860.

DANTAS, J.S., SOUZA, A.P., FARIAS, M.F. & NOGUEIRA, V.F.B. (2009). Interações entre grupos de micro-organismos com a rizosfera. *Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia* **2**, 213-218.

EL-SHARKAWY, M.A. (2012). Stress-tolerant cassava: The role of integrative ecophysiology-breeding research in crop improvement. *Open Journal of Soil Science* **2**, 162.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília, DF, *Embrapa Informação Tecnológica*, 627 p., 2009.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Agricultural production: Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.>Acesso dia 20/05/2014.

FERREIRA, D. F. Sisvar: Versão 5.1 (Build 72). *DEX/UFLA*. 2007.

FREY-KLETT, P., GARBAYE, J. & TARKKA, M. (2007). The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist*. **176**, 22-36.

GARBAYE, J. (1994). Helper Bacteria - A new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*. **128**, 197-210.

- GEORGE, E.K., HAUSSEIER, G., VETTERLEIN, E.G. & MARSCHNER, H. (1992). Water and nutrient translocation by hyphae of *Glomus mossae*. *Canadian Journal of Botany* **70**, 2130-2137.
- GERDEMANN, J.W. & NICOLSON, T.H. (1963). Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* **46**, 235-244.
- GRANT, C.A., PLATEN, D.N., TOMAZIEWICZ, D.J. & SHEPPARD, S.C. (2001). A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. *Informações agronômicas* **95**, 1-5.
- GYANESHWAR, P., JAMES, E.K., REDDY, P.M. & LADHA, J. (2002). *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. *New Phytologist* **154**, 131-145.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D. I. (1950). The water culture method for growing plants without soils. Berkeley: *California Agricultural Experimental Station*, 347p.
- HOWELER, R.H., CADAVID, L.F. & BURCKHARDT, E. (1982). Response of cassava to VA mycorrhizal inoculation and phosphorus application in greenhouse and field experiments. *Plant and Soil* **69**, 327-339.
- JÄDERLUND, L., ARTHURSON, V., GRANHALL, U. & JANSSON, J.K. (2008). "Specific interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting bacteria: as revealed by different combinations," *FEMS Microbiology Letters* **287**, 174-180.
- JARSTFER, A.G. & SYLVIA, D.M. (1992). Inoculum production and inoculation strategies for vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. In: Blaine Meeting Jr., F. (ed.), *Soil Microbial Ecology. Application in Agricultural and Environmental Management*. Marcel Decker, New York, p.349-369.
- JENKINS, W.R. (1964). A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* **48**, 629.
- JOHANSSON, J.F., PAUL, L.R. & FINLAY, R.D. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *Fems Microbiology Ecology* **48**, 1-13, 2004.
- KAI, M., HAUSTEIN, M., MOLINA, F., PETRI, A., SCHOLZ, B. & PIECHULLA, B. (2009). Bacterial volatiles and their action potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* **81**, 1001-1012.
- KAPE, R., WEX, K., PARNISKE, M., GORGE, E., WETZEL, A. & WERNER, D. (1993). Legume root metabolites and VA-mycorrhiza development. *Journal of Plant Physiology* **141**, 54-60.

- KAPOOR, R., SHARMA, D. & BHATNAGAR, A.K. (2008). Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. *Scientia Horticulturae* **116**, 227-239.
- KATO, O.R. (1987). Efeito de micorriza vesicular-arbuscular no crescimento e nutrição da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em solo adubado com doses crescentes de superfosfato triplo. Lavras: *ESAL*, 177p. Dissertação de Mestrado.
- LIMA, K.B., MARTINS, M.A., FREITAS, M.S.M. & OLIVARES, F.L. (2011). Fungos micorrízicos arbusculares, bactérias diazotróficas e adubação fosfatada em mudas de mamoeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura* **33**, 932-940.
- LIU, H.X., LI, S.M., LUO, Y.M., LUO, L.X., LI, J.Q. & GUO, J.H. (2014). Biological control of Ralstonia wilt, Phytophthora blight, Meloidogyne root-knot on bell pepper by the combination of *Bacillus subtilis* AR12, *Bacillus subtilis* SM21 and *Chryseobacterium* sp. R89. *European journal of plant pathology* **139**, 107-116.
- MARSCHNER, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. San Diego, *Academic Press*, 889p.
- MATTOS, P.L.P., SOUZA, A.S. & FILHO, J.R.F. (2006). Propagação. In: SOUSA, L.S., FARIAS, A.R.N., MATTOS, P.L.P. & FUKUDA, W.M.G. (Ed.). Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca. Cruz das Almas: *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical*, p. 70-214.
- MELLO, M.R.F., MARIANO, R.L.R., MENEZES, M., CÂMARA, T.R. & ASSIS, S.M.P. (2002). Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. *Summa Phytopathologica* **28**, 222-228.
- MIRANDA, J.C.C. (2008). Cerrado: Micorriza arbuscular, ocorrência e manejo. Planaltina: *Embrapa Cerrados*, 169p.
- MOHAMMADI, K., KHALESRO, S., SOHRABI, Y. & HEIDARI, G. (2011). A review: beneficial effects of the mycorrhizal fungi for plant growth. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences* **1**, 310-319
- MOREIRA, F.M.S., & SIQUEIRA, J.O. Micorrizas. (2002). In: MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e Bioquímica do solo. Lavras: UFLA, p. 473 - 578.
- MOREIRA, F.M.S., FARIA, S.M., BALEIRO, F.C. & FLORENTINO, L.A (2010). Bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos arbusculares em espécies florestais: avanços e aplicações biotecnológicas. In: Biotecnologia Aplicada à Agricultura. Recife, *Embrapa Informação Tecnológica*. Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) 761 p. 456-468.
- MORTIMER, P.E., PEREZ-FERNANDEZ, M.A. & VALENTINE, A.J. The role of arbuscular mycorrhizal colonization in the carbon and nutrient economy of the tripartite symbiosis with nodulated *Phaseolus vulgaris*. *Soil Biology and Biochemistry Oxford* **40**, 1019-1027, 2008.

- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- NAIR, M.G., SAFIR, G.R. & SIQUEIRA, J.O. (1991). Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 434-439.
- NICOLSON, T.H. & SCHENCK, N.C. (1979). Endogonaceous mycorrhizal endophytes in Florida. *Mycologia* **71**, 178-198.
- NOWAK, J. (1998). Benefits of in vitro "biotization" of plant tissue cultures with microbial inoculants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **34**, 122-130.
- OKIGBO, B.N. (1980). Nutritional implications of projects giving high priority to the production of staples of low nutritive quality. In the case for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in the humid tropics of West Africa. *Food and Nutrition Bulletin* **2**, 1-10.
- OLUKUNLE, O. T. (2013). "Evaluation of Income and Employment Generation from Cassava Value Chain in the Nigerian Agricultural Sector". *Asian Journal of Agriculture and Rural Development* **3**, 79-92.
- ORTAS, I., SARI, N., AKPINAR, Ç. & YETISIR, H. (2011). Screening mycorrhiza species for plant growth, P and Zn uptake in pepper seedling grown under greenhouse conditions. *Scientia horticultrae* **128**, 92-98.
- PANICKER, B., THOMAS, P., JANAKIRAM, T., VENUGOPALAN, R. & NARAYANAPPA, S.B. (2007). Influence of cytokinin levels on *in vitro* propagation of shy suckering chrysanthemum "Arka Swarna" and activation of endophytic bacteria. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* **43**, 614-622.
- PESSOA, J.S. (2009). Agrobiodiversidade e caracterização de etnovarietades de mandioca da reserva extrativista Cazumbá-Iracema, Acre. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, UFAC, p. 79.
- PHILLIPS, J. M. & HAYMAN, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* **55**, 157-160.
- PLENCHETTE, C., FORTIN, J. A. & FURLAN, V. (1983). Growth of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. *Plant and Soil* **70**, 199-209.
- RAAMAN, N. & PATHARAJAN, S. (2006). Integration of arbuscular mycorrhizal fungi with micropropagated plants. In: Current Concepts in Botany (Mukerji, K.G. & Manoharachary, C. eds.) I.K. International Publishing House, 235-251.
- REIS, V.M. (2004). Método de inoculação de bactérias diazotróficas em plantas de cana-de-açúcar micropropagadas. *Comunidade Técnico Embrapa Agrobiologia* **65**, 4p.

- REIS, V.M., ANDRADE, G., FARIA, S.M. & SILVEIRA, A.P.D. (2010). Interações de fungos micorrízicos com outros microrganismos do solo. In: SIQUEIRA, J.O.; SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. (org.). *Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil*. Lavras: UFLA. 361-382.
- RIEDLINGER, J., SCHREY, S.D., TARKKA, M.T., HAMPP, R., KAPUR, M. & FIEDLER, H.P. (2006). Auxofuran, a novel metabolite that stimulates the growth of fly agaric, is produced by the mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* strain AcH 505. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 3550-3557.
- ROCA, W.M., NOLT, B., MAFLA, G., ROA, J. & REYES, R. (1991). Eliminación de virus y propagación de clones en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). In: W.M. Roca & L.A. Mroginski (Eds.), *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*, CIAT, p. 403-420.
- RODRIGUES, A.C., ANTUNES, J.E.L., COSTA, A.F., PAULA OLIVEIRA, J. & FIGUEIREDO, M.D.V.B. (2013). Interrelationship of *Bradyrhizobium* sp. and plant growth-promoting bacteria in cowpea: survival and symbiotic performance. *Journal of Microbiology* **51**, 49-55.
- ROESCH, L.F., CAMARGO, F.O., SELBACH, P.A. & SÁ, E.S. (2005). Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. *Ciência Rural* **35**, 1201-1204.
- RUÍZ-SÁNCHEZA, M., ARMADAB, E., MUNOZA, Y., GARCÍA DE SALAMONEC, I.E., AROCAB, R., RUÍZ-LOZANOB, J.M. & AZCÓN, R. (2011). *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. *Journal of Plant Physiology* **168**, 1031-1037.
- SAGGIN JÚNIOR, O.J. & SILVA, E.M.R. (2005). Micorriza arbuscular: papel, funcionamento e aplicação da simbiose. In: AQUINO, A. M. de & ASSIS, R. L. de (Ed.). *Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável*. Brasília, DF: *Embrapa Informação Tecnológica*; Seropédica: *Embrapa Agrobiologia*, p. 101-149.
- SALA, V.M.R., FREITAS, S.S. & SILVEIRA, A.P.D. (2007). Interação de fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas em trigo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **42**, 1593-1600.
- SAYEED, A.M.S. & SIDDIQUI, Z.A. (2008). Biocontrol of a root-rot disease complex of chickpea by *Glomus intraradices*, *Rhizobium* sp. and *Pseudomonas straita*. *Crop Protection* **27**, 410-417.
- SHARMA, S.D., KUMAR, P. & YADAV, S.K. (2014). *Glomus*-*Azotobacter* association affects phenology of mango seedlings under reduced soil nutrient supply. *Scientia Horticulturae* **173**, 86-91.

- SILVEIRA, J.A.G., CONTADO, J.L., MAZZA, J.L.M. & OLIVEIRA, J.T.A. (1998). Phosphoenolpyruvate carboxylase and glutamine synthetase activities in relation to nitrogen fixation in cowpea nodules. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* **10**, 9-23.
- SOUZA, A. da S., JUNGHANS, T.G., SOUZA, F.V.D., SANTOS-SEREJO, J.A.dos., SILVA NETO, H.P. da., MENEZES, M.C., SILVEIRA, D.G. & SANTOS, V. da S. (2009). Micropropagação da mandioca. In: JUNGHANS, T.G. & SOUZA, A. da S. (Ed.). Aspectos práticos da micropropagação de plantas. Cruz das Almas: *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical*, p. 323-349.
- TRISTÃO, F.S.M., ANDRADE, S.A.L. & SILVEIRA, A.P.D. (2006). Fungos Micorrízicos Arbusculares na Formação de Mudanças de Cafeeiro em Substratos Orgânicos Comerciais. *Bragantia* **65**, 649-658.
- VARMA, A., BAKSHI, M., LOU, B., HARTMANN, A., & OELMUELLER, R. (2012). Piriformospora indica: a novel plant growth-promoting mycorrhizal fungus. *Agricultural Research* **1**, 117-131.
- XAVIER, L. J. & GERMIDA, J. J. (2003). Bacteria associated with *Glomus clarum* spores influence mycorrhizal activity. *Soil biology and biochemistry* **35**, 471-478.
- WANG, X., PAN, Q., CHEN, F., YAN, X. & H. LIAO. (2011). Effects of co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on soybean growth as related to root architecture and availability of N and P. *Mycorrhiza* **21**, 173-181.
- WATANABE, F.S. & OLSEN, S.R. (1965). Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO₃ extracts from soil. *Soil Science Society of America Proceedings* **29**, 677 – 678.

Tables

Table 1. Mycorrhizal colonization and number of glomerospores of micropropagated plants of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cv. (BRA Pretinha III) evaluated at 100 days after planting in relation to inoculation with PGPB and *Glomus clarum*

Treatments	Mycorrhizal colonization		N° of glomerspores *	
	(%)		50 g/solo	
S 30	80.00	ab	142.33	abc
BR 11140	76.67	ab	201.33	abc
BR 11175	77.00	ab	322.00	ab
BR 11284	79.33	ab	205.00	abc
S 30 + BR 11140	59.33	c	221.00	abc
S 30 + BR 11175	68.00	cb	191.00	abc
S 30 + BR 11284	85.67	a	245.00	abc
BR 11140 + BR 11175	79.67	ab	46.33	c
BR 11140 + BR 11284	89.33	a	142.00	abc
BR 11284 + BR 11175	77.67	ab	120.00	bc
CN	78.67	ab	240.33	abc
CT+AMF	81.67	ab	441.00	a
Means	77.75		209.78	
(%) CV	14.37		31.80	

Means followed by the same lower case letter in the same column do not differ by Tukey test ($P < 0.05$) *Azospirillum amazonense* (BR 11140), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284), *Streptomyces sp* (S 30), nitrogen control (NC) and absolute control (CT). *For statistical analysis, the glomerospores data were transformed into $y = (x + 0.5)^{0.5}$. Average of 3 repetitions

Table 2. Stem diameter of micropropagated plants of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cv. (BRA Pretinha III) evaluated in times 49, 65, 84 and 100 days after planting (DAP) in relation to inoculation of PGPBs and *Glomus clarum* in greenhouse

Treatments	Stem diameter mm							
	49		65		84		100	
	DAP							
	with AMF	non AMF	with AMF	non AMF	with AMF	non AMF	with AMF	non AMF
S 30	2.41 aA	1.57 aB	4.02 abA	1.82 aB	5.26 abA	2.08 aB	5.93 aA	2.11 aB
BR 11140	2.89 aA	1.78 aB	4.63 aA	1.94 aB	5.50 abA	1.99 aB	6.40 aA	2.23 aB
BR 11175	2.70 aA	1.48 aB	4.44 abA	1.62 aB	5.49 abA	1.90 aB	5.94 aA	2.00 aB
BR 11284	2.80 aA	1.72 aB	4.52 abA	1.77 aB	5.51 abA	1.90 aB	5.74 aA	2.27 aB
S 30+BR 11140	2.50 aA	1.71 aB	4.36 abA	2.06 aB	6.03 aA	2.11 aB	5.95 aA	2.17 aB
S 30+BR 11175	2.17 aA	1.67 aB	3.85 abA	2.15 aB	4.80 abA	2.29 aB	5.58 aA	2.57 aB
S 30+BR 11284	2.49 aA	1.57 aB	3.65 abA	1.77 aB	5.17 abA	1.85 aB	5.76 aA	1.98 aB
BR11140+BR 11175	2.49 aA	1.57 aB	4.35 abA	1.72 aB	5.14 abA	2.12 aB	5.58 aA	2.14 aB
BR 11140+BR 11284	2.19 aA	1.98 aB	3.84 abA	1.92 aB	4.71 abA	2.15 aB	5.79 aA	2.67 aB
BR 11284+BR 11175	2.88 aA	1.95 aB	4.53 abA	2.11 aB	5.53 abA	2.40 aB	5.78 aA	2.55 aB
CN	1.98 aA	1.93 aB	3.47 bA	2.24 aB	4.31 bA	2.39 aB	5.25 aA	2.54 aB
CT	2.28 aA	1.83 aB	3.84 abA	2.15 aB	4.92 abA	2.42 aB	5.67 aA	2.21 aB
Means	2.48	1.72	4.12	1.92	5.19	2.11	5.76	2.31
%CV	19.44		13.64		13.33		13.00	

Means followed by the same lowercase letter between treatments within the same column and capital letter between the AMF within the same row for each parameter do not differ by Tukey test ($P < 0.05$). *Azospirillum amazonense* (BR 11140), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284), *Streptomyces sp* (S 30), nitrogen control (NC) and absolute control (AC). Average of 3 repetitions

Table 3. Height of micropropagated cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) cv. (BRA Pretinha III) evaluated at times 49, 65, 84 and 100 days after planting (DAP) in relation to inoculation of PGPBs and *Glomus clarum* in greenhouse

Treatments	Seedling height							
	cm							
	49		65		84		100	
	DAP							
	with AMF	Non AMF	with AMF	Non AMF	with AMF	Non AMF	with AMF	Non AMF
S 30	9.33 aA	7.00 aB	18.67 aA	8.00 aB	25.17 aA	9.33 aB	30.83 aA	10.50 aB
BR 11140	11.67 aA	6.00 aB	15.83 aA	6.83 aB	21.50 aA	8.00 aB	25.00 aA	8.67 aB
BR 11175	9.67 aA	6.50 aB	16.17 aA	7.33 aB	23.17 aA	8.17 aB	26.50 aA	8.33 aB
BR 11284	10.67 aA	7.17 aB	15.83 aA	7.33 aB	22.67 aA	8.50 aB	27.83 aA	9.00 aB
S 30+BR 11140	8.83 aA	7.67 aB	13.33 aA	9.83 aB	17.83 aA	10.83 aB	20.67 aA	12.50 aB
S 30+BR 11175	7.33 aA	7.83 aB	15.00 aA	8.17 aB	20.00 aA	10.67 aB	24.00 aA	11.50 aB
S 30+BR 11284	8.17 aA	7.33 aB	13.00 aA	8.50 aB	19.17 aA	9.83 aB	23.33 aA	10.17 aB
BR11140+BR 11175	9.33 aA	5.67 aB	14.67 aA	7.17 aB	19.17 aA	8.83 aB	23.00 aA	10.33 aB
BR 11140+BR 11284	8.00 aA	8.33 aB	11.83 aA	8.83 aB	16.67 aA	10.17 aB	19.83 aA	11.00 aB
BR 11284+BR 11175	8.67 aA	7.00 aB	13.50 aA	8.33 aB	19.83 aA	10.17 aB	24.33 aA	11.17 aB
CN	8.50 aA	6.50 aB	15.67 aA	7.67 aB	23.50 aA	8,50 aB	29.33 aA	9.50 aB
CT	8.67 aA	7.83 aB	16.33 aA	8.17 aB	23.00 aA	9.83 aB	29.17 aA	10.33 aB
Means	9.07	7.07	14.99	8.01	20.97	9.40	25.32	10.25
%CV	27.98		26.63		30.48		32.74	

Means followed by the same lowercase letter between treatments within the same column and capital letter between the AMF within the same row for each parameter do not differ by Tukey test ($P < 0.05$). *Azospirillum amazonense* (BR 11140), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284), *Streptomyces sp* (S 30), nitrogen control (CT) and absolute control (CN). Average of 3 repetitions

Table 4. Root dry matter (RDM), shoot dry matter (SDM) and shoot dry matter / root dry matter (SDM/MSR) ratio of micropropagated cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) cv. (BRA Pretinha III) evaluated at 100 days after planting in relation to inoculation of PGPBs and *Glomus clarum*

Treatments	RDM				SDM				SDM/RDM			
	g/plant								g/g			
	with AMF		non AMF		with AMF		non AMF		with AMF		non AMF	
S 30	2.06	aA	0.15	aB	5.57	aA	0.24	aB	2.82	aA	1.82	aB
BR 11140	2.90	aA	0.12	aB	5.29	aA	0.22	aB	2.26	aA	1.25	aB
BR 11175	3.04	aA	0.08	aB	5.16	aA	0.15	aB	1.94	aA	1.81	aB
BR 11284	3.22	aA	0.13	aB	5.06	aA	0.22	aB	1.62	aA	1.74	aB
S 30+BR 11140	3.34	aA	0.23	aB	4.37	aA	0.34	aB	1.33	aA	1.48	aB
S 30+BR 11175	3.17	aA	0.22	aB	4.34	aA	0.37	aB	1.38	aA	1.66	aB
S 30+BR 11284	2.84	aA	0.16	aB	4.76	aA	0.28	aB	1.67	aA	1.73	aB
BR11140+BR 11175	3.15	aA	0.15	aB	4.83	aA	0.27	aB	1.58	aA	1.71	aB
BR 11140+BR 11284	2.09	aA	0.20	aB	5.22	aA	0.29	aB	2.53	aA	1.40	aB
BR 11284+BR 11175	2.43	aA	0.30	aB	4.93	aA	0.43	aB	2.08	aA	1.43	aB
CN	2.31	aA	0.22	aB	4.04	aA	0.33	aB	1.75	aA	1.48	aB
CT	2.53	aA	0.21	aB	5.22	aA	0.38	aB	2.24	aA	1.81	aB
Means	2.76		0.19		4.89		0.29		1.93		1.61	
%CV	37.63				21.09				28.68			

Means followed by the same lowercase letter between treatments within the same column and capital letter between the AMF within the same row for each parameter do not differ by Tukey test ($P < 0.05$). *Azospirillum amazonense* (BR 11140), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284), *Streptomyces* sp (S 30), nitrogen control (CN) and absolute control (CT). Average of 3 repetitions

Table 5. Nitrogen accumulated in the shoot dry matter ($N_{ac}SDM$) and nitrogen accumulated in the root dry matter ($N_{ac}RDM$) and crude protein and accumulated phosphorus content in the dry matter of shoots (PSDM) of micropropagated cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) cv. (BRA Pretinha III) evaluated at 100 days after planting in relation to inoculation of PGPBs and *Glomus clarum*

Treatments	$N_{ac}SDM$		$N_{ac}RDM$		Crude protein		PSDM	
	mg N/g SDM				%		g P/kg SDM	
	with AMF	non AMF	with AMF	non AMF	with AMF	non AMF	with AMF	
S 30	217.58 aA	9.97 aB	51.76 aA	5.43 aB	24.88 aA	25.41 abcA	3.20 a	
BR 11140	194.81 aA	8.34 aB	57.52 aA	3.98 aB	23.03 aA	23.82 abcA	3.11 a	
BR 11175	202.86 aA	6.49 aB	59.43 aA	2.51 aB	24.62 aB	29.72 aA	3.07 a	
BR 11284	200.99 aA	10.69 aB	73.91 aA	4.38 aB	25.13 aA	27.41 abcA	3.15 a	
S 30+BR 11140	160.87 aA	13.69 aB	60.74 aA	7.39 aB	22.97 aA	24.63 abcA	3.08 a	
S 30+BR 11175	189.22 aA	14.37 aB	61.09 aA	7.99 aB	27.25 aA	24.29 abcA	3.10 a	
S 30+BR 11284	205.47 aA	8.81 aB	73.89 aA	5.32 aB	27.17 aA	20.02 cB	3.18 a	
BR 11140+BR 11175	196.73 aA	10.06 aB	66.90 aA	4.91 aB	25.47 aA	22.91 abcA	3.12 a	
BR 11140+BR 11284	175.62 aA	10.61 aB	50.34 aA	7.13 aB	21.18 aA	23.59 abcA	3.12 a	
BR 11284+BR 11175	189.59 aA	15.66 aB	48.70 aA	10.38 aB	24.01 aA	22.49 abcA	3.22 a	
CN	167.86 aA	14.65 aB	65.86 aA	6.84 aB	26.01 aA	28.29 abA	3.17 a	
CT	219.36 aA	12.74 aB	59.57 aA	7.24 aB	26.31 aA	20.68 bcB	3.20 a	
Means	193.41	11.34	60.81	6.13	24.84	24.44	3.14	
%CV	20.17		32.00		11.26		2.67	

Means followed by the same lowercase letter between treatments within the same column and capital letter between the AMF within the same row for each parameter do not differ by Tukey test ($P < 0.05$). *Azospirillum amazonense* (BR 11140), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284), *Streptomyces* sp (S 30), nitrogen control (CN) and absolute control (CT). Average of 3 repetitions

Figures

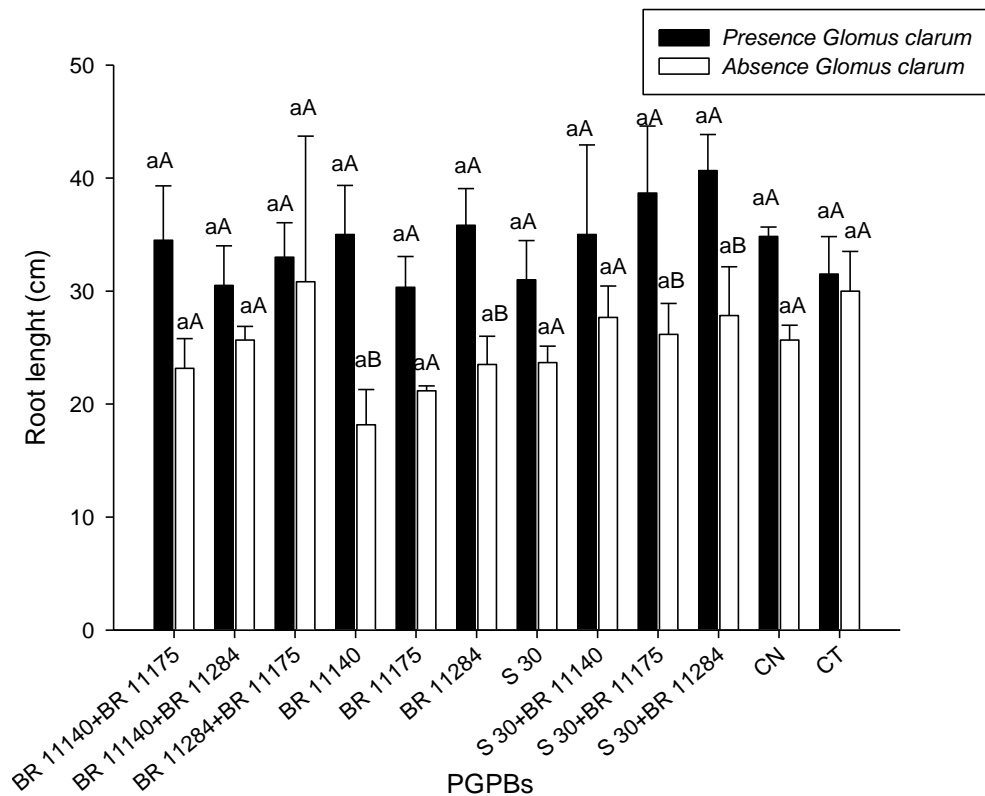


Figure 1. Root length of micropropagated plants of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cv. (BRA Pretinha III) evaluated at 100 days after planting in relation to inoculation of PGPBs and *Glomus clarum* in the greenhouse. Equal lowercase letters between treatments (PGPBs) and equal capital letters between presence and absence of *Glomus clarum* do not differ by Tukey test ($P < 0.05$). *Azospirillum amazonense* (BR 11140), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284), *Streptomyces sp* (S 30), nitrogen control (CN), and absolute control (CT). Average of 3 repetitions. %CV = 24.96.

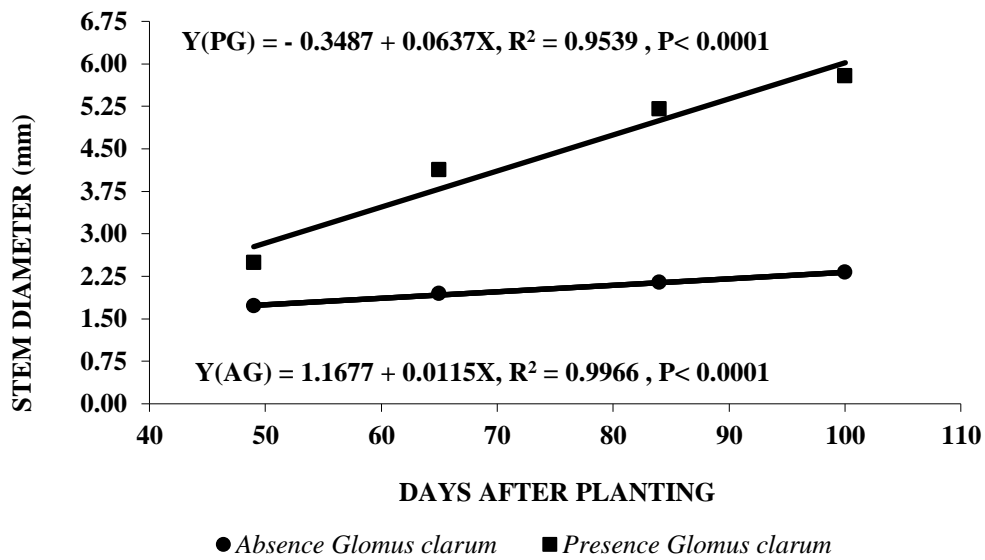


Figure 2. Stem diameter of micropropagated plants of cassava depending on the presence or absence of *Glomus clarum* at 49, 65, 84 and 100 days after planting in the greenhouse

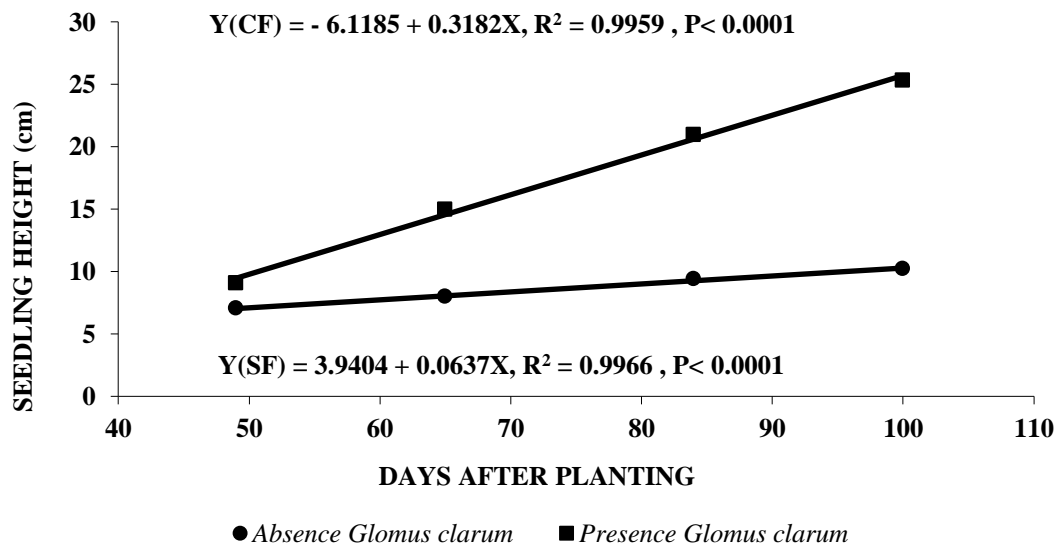


Figure 3. Height of micropropagated plants of cassava depending on the presence or absence of *Glomus clarum* at 49, 65, 84 and 100 days after in greenhouse

Capítulo III

Interrelação BPCPs e *Glomus clarum* em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) micropropagadas no Espodossolo

O artigo deste capítulo será submetido para publicação no periódico Applied Soil Ecology

**Interrelação BPCPs e *Glomus clarum* em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)
micropropagadas no Espodossolo**

Esmeralda Aparecida Porto Lopes^a, Antônio Dias Santiago^b, José de Paula Oliveira^c,
Almir Dias Alves da Silva^c & Márcia do Vale Barreto Figueiredo^{d*}

^aDoutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil.

^bEmpresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)- Tabuleiros Costeiros, CEP 57100-000, Rio Largo, AL, Brasil.

^cInstituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), CEP 50761-000, Recife, Pernambuco, Brasil.

^{d*}Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA/SEAGRI), CEP 50761-000, Recife-PE, Brazil. Av. Gal San Martin, 1371, Bongi - CEP 50761-000 - Recife - PE, Tel. +55 81 31847343; email: mbarreto@elogica.com.br

ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is an excellent source of calories, occupying a prominent place among crops grown in tropical countries. Its greatest importance is given mainly because it is traditionally one of the cheapest foods used by man, both in fresh and/or industrial form. As it is grown almost mainly by small farmers in low-income and low-nutrient areas, it has shown low productivity over decades. The use of microorganisms, whose interaction is beneficial, may be the only viability and sustainability possibility of agricultural systems that have low phosphorus and nitrogen contents, although available in sufficient quantities to supply plant growth, resulting in greater agricultural production. The aim of this study was to evaluate the interrelation between PGPBs and *Glomus clarum* in micropropagated plants of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) on the Spodosol soil. The experiment was conducted in field at the Experimental Station of Itapirema-IPA. The PGPBs were: *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284) and *Streptomyces sp.* (S30), mixed with double inoculation (*Streptomyces sp* + *H. Seropedicae*), (*Streptomyces sp* + *G. diazotrophicus*), (*H. seropedicae* + *G. diazotrophicus*) and triple inoculation (*Streptomyces sp* + *G. diazotrophicus* + *H. seropedicae*). The mycorrhizal fungus used was *G. clarum* and the cassava cv. was "BRA Pretinha III". The experimental design was of randomized blocks, with ten treatments and four replications. The treatments had inoculation of 3 individual bacterial strains and 4 mixed + 3 controls (CT + AMF, CN + AMF and CT without AMF). After 203 days of cultivation, the variables analyzed were: plant height, stem diameter, root length, shoot dry matter yield, root dry matter, relation between shoot/root dry matter, nitrogen accumulated in the shoot and root, P content in shoot and root, starch content, AMF glomerospores number and % of AMF colonization. It was concluded that the strains of plant growth-promoting bacteria (PGPBs) inoculated in the cv. "BRA Pretinha III" cassava influenced mycorrhizal colonization and glomerospores number. The micropropagated "BRA Pretinha III" cultivar showed low productivity, suggesting that it was due to cultivation in the first generation. The starch content in the cv. "BRA Pretinha III" cassava was satisfactory to the values required by the industry. The applied dose of nitrogen fertilizer have not contributed in optimizing the cv. "BR Pretinha III" cassava in any evaluated variable, inferring low economic and ecological cost with micro-organisms application. The fungi mix identified in the study area should be isolated and multiplied for use as inoculum in future research, as well as to enhance studies with new biological inputs formulations for cassava, aimed at increasing the productivity of this crop under conditions of micropropagation and/or spread in the field.

1. Introdução

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é excelente fonte de calorias, ocupando local de destaque entre as culturas exploradas nos países tropicais. Sua maior importância se dá, principalmente, pelo fato de ser tradicionalmente um dos alimentos básicos mais baratos utilizados pelo homem, seja na forma fresca à mesa e/ou na forma industrial (FAO, 2014).

No Brasil é cultivada em quase todo o Território Nacional, ocupando uma área de 1,5 milhões de hectares e com uma produção de 21 milhões de toneladas de raiz, sendo a base econômica de milhares de pequenas propriedades e a segurança alimentar de milhões de brasileiros, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país, o qual tem como maiores produtores os estados do Pará, Paraná, Bahia e Maranhão que, juntos, representam cerca de 55% da produção nacional (IBGE, 2014).

Embora o país ocupe a 4ª colocação no ranking entre os principais países produtores de mandioca, sua produtividade tem apresentado ao longo de décadas uma média em torno de 13 t ha⁻¹ (IBGE, 2014), e isto tem sido atribuído ao fato dessa cultura apresentar uma notável tolerância a estresses abióticos, ser comumente cultivada em solos com baixo teor de nutrientes e sem a aplicação de fertilizantes (Fukuda et al., 1997a). Entretanto, apesar de tão adaptável à condições extremas, ela extrai elevadas quantidades de nutrientes do solo, principalmente N e K (Souza et al., 2006). Além disso, não responde de maneira consistente à adubação nitrogenada, mesmo em solos com baixa disponibilidade de nutrientes. Tal característica tem sido relacionada à associação de micro-organismos envolvidos na nutrição com nitrogênio, fósforo e outros nutrientes do solo (Gomes and Silva, 2006).

Entre estes micro-organismos, as bactérias representam domínio mais abundante, como também desempenham papel importante na ciclagem de nutrientes. Um desses processos é a fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN), que é realizada por bactérias conhecidas como diazotróficas, as quais apresentam alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética. Tal diversidade garante a ocorrência delas nos mais diferentes habitats, podendo ser de vida livre, estar associadas a espécies vegetais ou, ainda, estabelecer simbiose com leguminosas (Moreira et al., 2013).

Além da FBN, a síntese de fitormônios pelas bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) é, provavelmente, um dos mecanismos mais

importantes sobre o desenvolvimento vegetal, tendo em vista que eles podem promover alterações morfológicas no sistema radicular, incluindo aumento no comprimento e volume radicular, número e comprimento das raízes laterais (Bashan & De-Bashan, 2010), e isso tem sido associado ao aumento da resistência vegetal contra estresses hídricos e nutricionais, além do aumento da eficiência de uso da água e de fertilizantes (Figueiredo et al., 2008; Carvalhais et al., 2013).

Outro grande grupo de micro-organismos que merece destaque são os fungos micorrízicos arbusculares, os quais são de ocorrência generalizada nas diferentes condições de clima e ecossistemas, e interagem com a maioria das plantas terrestres, o que os tornam de grande importância econômica e ecológica (Schüßler et al., 2001). Esta importância se dá pelo incremento no desenvolvimento das plantas, atribuído à maior capacidade da planta de absorver água e nutrientes, em especial aqueles que apresentam baixa mobilidade no solo, como o fósforo. Este aumento na capacidade de absorção de nutrientes é de grande interesse, principalmente em condições tropicais, onde os solos apresentam baixos teores de fósforo disponível, devido a alta capacidade de fixação (Stümer & Siqueira, 2013).

Apesar da ocorrência de BPCPs na mandioca (Teixeira et al., 2007) e de ser considerada uma das culturas mais dependentes da associação micorrízica (Balota et al., 1997), pouco ainda se conhece sobre o potencial da inoculação das bactérias diazotróficas em plantas de mandioca micropropagadas e sua interação com FMA em condições de campo.

Nesse sentido, sabendo que a cadeia produtiva da mandioca é formada em sua grande parte por pequenas propriedades rurais que adotam pouca tecnologia e que o custo dos adubos químicos eleva o custo da produção, a hipótese de que o uso de combinações de micro-organismos que apresentem compatibilidade, diferente capacidade metabólica e alto potencial de interação com a mandioca cv. “BRA Pretinha III” poderá garantir uma maior independência aos insumos industrializados viabilizando a sustentabilidade dos sistemas agrícolas. Foram avaliadas diferentes BPCPs inoculadas isoladamente com o *Glomus clarum* e em mistura com o *G. clarum* onde foram analisados diferentes parâmetros biológicos e fisiológicos neste estudo.

2. Material e Métodos

2.1. Área de estudo

O experimento foi conduzido em campo na Estação Experimental de Itapirema - Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), localizada no município de Goiana/PE (latitude 7°38'S, longitude 34°56'W e altitude média de 13 m ao nível do mar) (BELTRÃO et al., 2005) em um solo classificado como Espodosolo Cárbico Órtico (Embrapa, 2013), com as seguintes características: profundidade (0-20 cm) - $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ 5,50; 16 mg dm^{-3} de P; 0,06 cmolc dm^{-3} de K; 1,30 cmolc dm^{-3} de Ca^{2+} ; 0,70 cmolc dm^{-3} de Mg^{+2} ; 0,15 cmolc dm^{-3} de Al e 4,63 cmolc dm^{-3} de H, apresentando uma textura arenosa e na profundidade (20-40 cm) $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ 5,20; 5 mg dm^{-3} de P; 0,03 cmolc dm^{-3} de K; 0,70 cmolc dm^{-3} de Ca^{2+} ; 0,70 cmolc dm^{-3} de Mg^{+2} ; 0,10 cmolc dm^{-3} de Al apresentando uma textura franco arenosa (Embrapa, 2009).

O clima é do tipo tropical chuvoso com verão seco. O período chuvoso começa no outono tendo início em fevereiro e término em outubro. A precipitação média anual é de 1.634 mm (Beltrão et al., 2005). As precipitações registradas durante o experimento estão apresentadas na Figura 1.

2.2. Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso, com dez tratamentos e 4 repetições. Os tratamentos foram a inoculação de 3 estirpes bacterianas individuais e 4 em mistura + 3 testemunhas (TA – tratamento controle + FMA, TN - tratamento nitrogenado + FMA e TA - tratamento controle sem FMA). O fungo micorrízico utilizado foi o *Glomus clarum*, e o cultivar de mandioca foi “BRA Pretinha III”. As bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs) utilizadas foram: *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284) e *Streptomyces sp.* (S 30), e em mistura com dupla inoculação (*Streptomyces sp* + *H. seropedicae*), (*Streptomyces sp* + *G. diazotrophicus*), (*H. seropedicae* + *G. diazotrophicus*) e em tripla inoculação (*Streptomyces sp* + *G. diazotrophicus* + *H. seropedicae*).

As estirpes bacterianas *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284) foram provenientes da coleção do Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB), *Streptomyces sp.* (S 30) da coleção da Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Antibióticos - UFPEDA), e o fungo *Glomus clarum* (Nicolson and Schenck, 1979) foi cedido pelo Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB).

O cv. “BRA Pretinha III” é de domínio público recomendado para regiões de clima semiárido, precoce e indicada para uso no processamento industrial das raízes para obtenção de farinha, fécula e seus derivados. Tendo como características morfológicas uma altura de 1,7 m; 0,500 kg de folhagem por planta; 1,15 kg de ramas + cepas por planta; 1,4 kg de raiz por planta e 28,9 % de teor de amido (Fukuda et al., 1997b).

2.3. *Multiplificação e preparação dos inoculantes bacterianos e fúngico*

Para a obtenção dos inoculantes, as estirpes foram crescidas em frascos erlenmeyers contendo meios de cultura específicos. As estirpes BR 11140, BR 11175 e BR 11284 foram crescidas em meio de cultura DYGS (Dextrose Yeast Glucose Sucrose) durante 48 horas, enquanto que a estirpe S 30 cresceu em meio de cultura ALA (Arginina, Levedura e Ágar) durante 120 horas. Todas as estirpes foram submetidas à agitação constante de 200 rpm em temperatura de 29°C.

O *Glomus clarum* foi multiplicado em casa de vegetação, em vasos de cultivo com capacidade de 3,0 kg solo vaso⁻¹, contendo uma mistura de solo (Espodossolo):vermiculita (2:1 v/v) previamente autoclavado a 120°C, 101 KPa, por 1 hora e três dias consecutivos, tendo como planta hospedeira o painço (*Panicum miliaceum* L.). Após a multiplicação, o inóculo produzido foi avaliado quanto ao número de glomerosporos empregando-se as técnicas de decantação e peneiramento úmido (Gerdemann and Nicolson, 1963), e complementado pela técnica da centrifugação e flutuação em sacarose (50%) (Jenkins, 1964). A contagem dos esporos foi realizada em placas canaletadas e microscópio estereoscópio (40 x).

2.4. *Inoculação das BPCPs nas plântulas de mandioca*

As plântulas de mandioca foram obtidas através do cultivo de meristemas, de acordo com o protocolo de Souza et al. (2009), em que as manivas foram selecionadas, desinfestadas, plantadas em bandejas para germinação contendo uma mistura de substrato comercial “Carolina padrão” (pH_{H2O} (5,0+/-0,5); condutividade elétrica (7 µS/cm+/-0,3), capacidade de retenção de água (55%) e umidade máxima (60%)) + areia lavada (1:1), autoclavada a 120°C, 101 kPa, por 1 hora, e mantidas em casa de vegetação até a brotação. Os brotos foram colhidos, desinfestados em câmara de fluxo

laminar e os ápices foram isolados e estabelecidos em meio nutritivo MS (Murashige and Skoog, 1962), suplementado com tiamina-HCl (1mg/L), inositol (100 mg/L), ácido naftalenoacético (ANA) (0,02 mg/L), benzilaminopurina (BAP) (0,04 mg/L), ácido giberélico (AG3) (0,05 mg/L), sacarose (20 g/L) (Roca et al., 1991), ágar (8 g/L).

A multiplicação foi conduzida quando a planta alcançou o tamanho de 10 cm de comprimento, foi seccionada em várias microestacas e, em seguida, inseridas em novo meio MS com a mesma composição básica do meio para o estabelecimento dos ápices, variando apenas nas concentrações dos reguladores ANA, BAP e AG3, que passaram a ser todos 0,01 mg/L.

Nas duas etapas (estabelecimento e multiplicação) o pH foi ajustado para 5,7 e as plantas foram mantidas em sala de crescimento, sob condições de temperatura de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, luz artificial (1948 lux) com um fotoperíodo de 16 horas.

Quando apresentaram raízes e folhas em abundância, foram individualizadas, lavadas com água destilada autoclavada, parte de suas raízes cortadas (2 cm) e, em seguida, transferidas para tubos de ensaio com meio de cultivo MS modificado (sem hormônios, com a concentração de sacarose e nutrientes reduzida 10 vezes e sem ágar), conforme metodologia de Reis (2004). Em seguida, foram inoculadas com uma suspensão de bactérias crescidas em meio específico, apresentando uma densidade bacteriana de $\sim 10^8$ células mL^{-1} . Para os tratamentos com estirpes individuais, foram inoculadas uma suspensão de 2 mL, já os com dupla inoculação com 1 mL de cada estirpe, enquanto que, àqueles com tripla inoculação receberam 0,67 mL de cada estirpe. Na testemunha absoluta (TA) não foi acrescida suspensão de bactérias. As plantas foram mantidas em sala de crescimento por 10 dias à $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, sob luz artificial (1948 lux) com um fotoperíodo de 16 horas.

2.5. Aclimatização

As plântulas oriundas da cultura de tecido e inoculadas com BPCPs foram lavadas com água destilada autoclavada, para retirar o excesso de meio MS e plantadas em copos descartáveis de plástico de 0,5 L preenchidos com uma mistura autoclavada de solo Espodossolo + substrato comercial na proporção de 1:1 (pH 6,0). Todos os tratamentos, com exceção da testemunha sem *G. clarum* (TA-SF), receberam uma alíquota de 1,40 g de propágulo, contendo aproximadamente 200 glomerosporos. O substrato foi umedecido e cada plântula foi coberta com copo descartável branco para

manutenção da umidade, conforme descrito por Souza et al. (2009). Após 20 dias após o plantio (DAP), os copos de cobertura foram eliminados e as plântulas mantidas durante 34 dias aclimatando. As plantas foram nutridas semanalmente com solução de Hoagland and Arnon (1950), isenta de P e N, conforme Jarstfer and Sylvia (1992) e Silveira et al. (1998). A umidade foi mantida na capacidade de pote.

2.6. Instalação e condução do experimento

Na área experimental foi aplicado o equivalente a 0,5 t ha⁻¹ de calcário dolomítico antes do preparo do solo. O solo foi preparado com aração a 30 cm de profundidade e duas gradagens, para destorroamento e nivelamento. Após 60 dias, foi realizada a adubação conforme a análise do solo e recomendação para Pernambuco (Silva and Santos, 2014). Todos os tratamentos receberam 68,9 kg de K ha⁻¹ na forma de KCl, e a testemunha nitrogenada recebeu 45,4 kg de N ha⁻¹ na forma de uréia. Não foi aplicado o fósforo (P).

A parcela experimental foi de 17,4 m² (5,8 m x 3,00) e a mandioca foi plantada em covas em fileiras duplas, no espaçamento de 2,00 x 0,60 x 0,60, totalizando 30 plantas por parcela. Destas, 12 faziam parte da parcela útil.

O transplante das mudas de mandioca para o campo ocorreu aos 35 dias após aclimatizadas. Para permitir uma melhor cobertura do solo e agregar resíduos culturais foram plantadas entre as fileiras de cada parcela e no mesmo dia do transplante da mandioca, sementes de mucuna-preta (*Mucuna aterrina*) em sulcos espaçados de 0,5 m. Por ocasião da semeadura, a estirpe de *Bradyrhizobium sp.* (SEMIA 6158) da coleção de cultura da FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária) foi inoculada nas sementes da mucuna. Para o preparo do inóculo, a estirpe de *Bradyrhizobium sp.* (SEMIA 6158) foi semeada em frascos erlenmeyer, contendo 50 mL de meio de cultura YM, e mantida sob agitação constante (200 rpm; 28 °C) durante 96 horas. A concentração de bactérias utilizada foi de ~10⁸ células mL.

Aos 5 dias após o plantio, as plantas de mandioca foram reinoculadas com uma suspensão de bactérias crescidas em meio específico, apresentando uma densidade bacteriana de ~10⁸ células mL⁻¹. Para os tratamentos com estirpes individuais, as plantas foram inoculadas com uma suspensão de 50 mL, com a dupla inoculação de estirpes, 25 mL de cada estirpe, enquanto que, àquelas com tripla inoculação, com 17 mL de cada

estirpe. Nas testemunhas (TA + FMA, TN + FMA e TA sem FMA) não foi acrescida suspensão de bactérias.

Aos 60 DAP as plantas de mucuna-preta foram cortadas rente ao solo e mantidas como cobertura morta na superfície. Durante o período experimental foram efetuadas quatro capinas manuais e não foi necessário irrigar. A colheita da mandioca foi efetuada aos 203 dias após o plantio incluindo a etapa de aclimatização e foram avaliadas as seguintes variáveis: altura da planta, diâmetro do caule, rendimentos da matéria seca parte aérea (RMSPA) e raiz (RMSR), nitrogênio acumulado na matéria seca parte aérea ($N_{ac}MSPA$), nitrogênio acumulado na matéria seca raiz ($N_{ac}MSR$), determinado pelo método Kjeldhal segundo Embrapa (2009), relação matéria seca parte aérea/matéria seca raiz (MSPA/MSR), índice de colheita (IC) = (massa de raízes/massa de raízes + massa da parte aérea) x 100 (Otsubo et al., 2008), teor de P na matéria seca parte aérea (PMSPA) e na raiz (PMSR) (Watanabe and Olsen, 1965), teor de amido, conforme metodologia da balança hidrostática descrita por Grossmann and Freitas (1950), proteína bruta (PB = % de N x 6,25), número de glomerosporos foi avaliado por contagem, empregando as técnicas descritas anteriormente, colonização das raízes conforme Phillips and Hayman (1970). Para identificação dos gêneros dos FMA foi utilizada a abordagem morfológica, no qual os glomerosporos similares foram agrupados em lâminas com PVLG e com Melzer + PVLG (1:1) (Morton et al., 1993) e classificadas taxonomicamente de acordo com Dr. Fritz Oehl (Research Institute Agroscope Reckenholz/Zürich), Schenck and Perez (1990) e Blaszkowski (2012).

2.7. *Análise estatística*

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando-se o programa estatístico SASM-Agri (Canteri et al., 2001), com níveis de significância de 5% pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1. *Colonização micorrízica, número de glomerosporos e gêneros de FMA autóctones*

Na taxa de colonização das raízes de mandioca, observou-se que aos 203 dias após o plantio, houve diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre a tripla

inoculação (S 30 + BR 11284 + BR 11175) *Streptomyces sp* + *G. diazotrophicus* + *H. seropedicae* e as duplas (S 30 + BR 11284; BR 11284 + BR 11175) em relação a estirpe BR 11284 (*G. diazotrophicus*) (Tabela 1). Estas combinações promoveram aumentos em torno de 22% em relação a BR 11284. Já em relação ao número de glomerosporos, as bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs) também promoveram efeitos significativos ($p < 0,05$) sobre o número de glomerosporos de FMA no solo (Tabela 1), que variou de 36 a 293 esporos g solo⁻¹, sendo que o maior estímulo na produção de novos esporos ocorreu quando o *G. clarum* foi co-inoculado com a estirpe BR 11175 (*Herbaspirillum seropedicae*), promovendo incrementos de 720% e 687%, em relação à testemunha nitrogenada com *Glomus clarum* (TN + FMA) e testemunha absoluta (TA), respectivamente. Apesar da estirpe S 30 (*Streptomyces sp*) diferir estatisticamente ($p < 0,05$) da BR 11175, ela também aumentou a esporulação do FMA quando comparada às duplas inoculações com S 30 + BR 11175, S 30 + BR 11284 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*), à tripla (S 30 + BR 11284 + BR 11175) e às TAs (Testemunhas). Tanto as duplas inoculações, quanto a tripla inoculação de BPCPs não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) da TA, TN + FMA e TA + FMA.

Os FMA autóctones registrados na área de cultivo da mandioca foram identificados aos 200 dias após o plantio e os gêneros encontrados foram: *Acaulospora sp*, *Cetraspora sp*, *Fuscutata sp*, *Gigaspora sp*, *Glomus sp*, *Racocetra sp*, e *Scutellospora sp*. (Figura 2).

3.2. Avaliação da promoção de crescimento vegetal

Nas variáveis taxa de sobrevivência (TS), diâmetro do caule (DC), altura da planta (AP), índice de colheita (IC), rendimento da matéria seca raiz (RMSR) e teor de amido (Tamido) do cultivar “BRA Pretinha III”, quando cultivadas no campo, não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) quando inoculadas com as BPCPs e co-inoculadas com *G. clarum* (Tabelas 2 e 3). Os valores médios observados foram 79,37% (TS), 18,13 mm (DC), 52,29 cm (AP), 48,97% (IC), 683,26 kg ha⁻¹ (RMSR) e 28,16% (Tamido). Já quanto ao rendimento da matéria seca da parte aérea (RMSPA), observou-se que não ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) entre a TN + FMA e os demais tratamentos inoculados e não inoculados, exceto em relação à dupla inoculação S 30 + BR 11284 (*Streptomyces sp* + *Gluconacetobacter diazotrophicus*) (Tabela 3).

3.3. Nitrogênio e fósforo acumulado na matéria seca da parte aérea e nas raízes e porcentagem de proteína bruta na parte aérea.

Em relação ao conteúdo de nitrogênio (N) acumulado na matéria seca parte aérea ($N_{ac}MSPA$) e o teor de proteína bruta (PB) verificou-se que não ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) nestas variáveis quando as plantas foram inoculadas com as BPCPs + FMA (Tabela 4), contudo, o mesmo não ocorreu quanto ao N acumulado na matéria seca raiz ($N_{ac}MSR$), em que observou-se que as BPCPs + FMA favoreceram um maior $N_{ac}MSR$ quando as plantas foram inoculadas com a tripla inoculação S 30 + BR 11284 + BR 11175 + FMA (Tabela 4). Estas BPCPs quando combinadas promoveram um incremento de 81,6% e 69,9% em relação às duplas S 30 + BR 11284 + FMA e BR 11284 + BR 11175 + FMA, respectivamente. Observou-se também que mesmo a tripla inoculação não diferindo da testemunha absoluta (TA) e da testemunha nitrogenada (TN), ela promoveu uma transferência de N para as raízes de 49% e 13% quando comparadas a TA e TN, respectivamente, dispensando o uso do fertilizante nitrogenado, o que contribui para um significativo ganho ambiental, além da redução de custos. O estudo também mostrou que as BPCPs co-inoculadas com o *G. clarum* não alteraram os teores de fósforo na parte aérea (PMSPA) e na raiz (PMSR) do cv. “BRA Pretinha III” ao nível de $p < 0,05$. Os teores médios encontrados foram de $3,43 \text{ g kg}^{-1}$ e $2,43 \text{ g kg}^{-1}$ de P na matéria seca da parte aérea e na raiz, respectivamente.

4. Discussão

4.1. Colonização micorrízica, número de glomerosporos e gêneros de FMA autóctones

O estudo mostrou que a mandioca apresentou uma alta colonização micorrízica (80,25%), revelando a grande infectividade dos FMAs presentes nas condições naturais do solo. Esta alta colonização pode estar relacionada com o elevado grau de micotrofismo da mandioca, porém, inúmeros outros fatores também podem influenciar a colonização micorrízica, como as propriedades químicas e físicas do solo, as condições ambientais, como também, aspectos inerentes à própria planta, como a sanidade e fenologia (Colozzi and Nogueira, 2007). Estudos realizados em campo têm relatado porcentagem de colonização micorrízica da mandioca variando de 31 a 85 % (Balota et al., 1999; Burns et al., 2012) corroborando com os resultados do presente trabalho.

Verificou-se também que a tripla inoculação (S 30 + BR 11284 + BR 11175) *Streptomyces sp* + *G. diazotrophicus* + *H. seropedicae* e as duplas (S 30 + BR 11284; BR 11284 + BR 11175) apresentaram uma maior compatibilidade funcional com o cv. “BRA Pretinha III”, visto que promoveram uma maior taxa de colonização micorrízica do que a estirpe BR 11284, fato que pode estar relacionado com a síntese de metabólitos, pois de acordo com Carvalho and Moreira (2010), os processos de infecção radicular por FMA e por BPCPs são mediados por trocas de sinais moleculares entre a planta e os microssimbiontes; tanto os exsudatos da planta podem influenciar os FMA e as BPCPs, quanto os FMA podem acelerar um maior estabelecimento e crescimento de bactérias diazotróficas, ou vice e versa.

Os efeitos das BPCPs no aumento da esporulação verificados neste estudo, corroboram com os observados por Balota et al. (1997) que estudando a inoculação de *Burkholderia sp* + FMA em plantas de mandioca micropropagadas, verificaram aumento de 168% na produção de esporos de *Glomus clarum* em solo esterilizado. A co-inoculação de *Azotobacter chroococcum* e *Glomus fasciculatus* em plantas de tomate também favoreceu aumento na produção de esporos do FMA (Bagyaraji and Menge, 1978) em solo esterilizado e não esterilizado. Soares et al. (2009), observaram que as estirpe *Bacillus sp.* (RAB9) e *B. thuringiensis* subvar. *kurstakii* Beliner (ENF10) estimularam a germinação de *Gigaspora albida* e *Glomus etunicatum*, respectivamente, por outro lado, a estirpe *Bacillus cereus* (C210) inibiu a germinação de *G. albida in vitro*.

Embora ainda não esteja completamente esclarecida a importância funcional das bactérias para os esporos (Cruz and Ishii, 2011), a maior esporulação verificada neste estudo, revela que o *G. clarum* foi seletivo quanto às estirpes de BPCPs. De acordo com Garbaye (1994), algumas populações bacterianas, chamadas de bactérias que auxiliam as micorrizas (MHB), têm efeitos benéficos sobre o crescimento de FMA não só estimulando a taxa de crescimento do FMA, mas também facilitando a germinação do esporo (Pivato et al., 2009). Estas MHB podem ocorrer na superfície e dentro dos esporos e hifas (Bianciotto et al., 2004; Bonfante and Anca, 2009; Gopal et al., 2012). Benefícios promovidos por MHB em *G. clarum* foram demonstrados por Xavier and Germida (2003), que verificaram a ocorrência dos gêneros *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Flavobacterium* e *Pseudomonas* em seus esporos e que os mesmos influenciaram estimulando a germinação de esporos. Tais benefícios produzidos pelas MHB podem ser químicos por meio de exsudatos, como os ácidos orgânicos (Duponnois and Garbaye, 1990), compostos voláteis (etileno) e compostos não voláteis

(Horii and Ishii, 2006) ou físicos (biofilmes) devido a sua agregação nas superfícies de esporos e hifas facilitando a penetração das hifas no solo e nos tecidos vegetais, além de suprimir patógenos e afetar a biodinâmica dos nutrientes (Cruz & Ishii, 2011).

Nesse sentido, sugere-se que as estirpes BR 11175 (*Herbaspirillum seropedicae*) e S 30 (*Streptomyces sp*) sejam melhores exploradas em combinações com FMA, com o intuito de otimizar a formação e o funcionamento das simbioses micorrízicas.

Quanto ao efeito do fertilizante nitrogenado, o estudo mostrou que a dose de 45,4 kg de N ha⁻¹ (testemunha nitrogenada + FMA) na forma de uréia não estimulou a colonização nem a esporulação dos FMA. Resultados semelhantes foram observados por Andreola (1982) que, aplicando ureia, pode verificar que este adubo não afetou a colonização e o número de esporos de FMA associados à cana-de-açúcar. De acordo com Bethlenfalvy et al. (1999), a densidade de esporos e hifas podem aumentar ou diminuir em resposta a adubação mineral com N, já para Saito et al. (2011), espécies de plantas que são adaptadas às condições de déficit de N, podem se beneficiar dos FMA através desta absorção de N, porém a fertilização nitrogenada para estas plantas pode inibir a colonização micorrízica e a esporulação dos FMA da mesma forma que a fertilização fosfatada pode inibir a colonização e esporulação dos FMA e, isto pode variar segundo a espécie fúngica e a planta hospedeira (Carrenho et al., 2010).

Em relação à comunidade dos FMA autóctones identificados na área de cultivo, os gêneros *Acaulospora*, *Scutellospora* e *Glomus* também foram registrados por Balota et al. (1999), ao verificarem as espécies de FMA relacionadas às plantas de mandioca nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Parana. Segundo Carrenho et al. (2010). As comunidades nativas de FMA são bastante variadas em relação à composição de espécies, pois a ocorrência destas é influenciada pela vegetação e pelo ambiente e, apenas algumas se revelam eficientes em promover o crescimento das plantas (Howeler et al., 1987). Em solos tropicais a mandioca, geralmente, é mais associada com *Glomus clarum* (Sieverding, 1991). Em um estudo de campo, Fagbola et al. (1998) observaram que a inoculação de *G. clarum* promoveu um incremento de 50% na taxa de colonização micorrízica quando comparadas às plantas de mandioca apenas com FMA nativos. As razões dessas variações interespecíficas dos FMA podem estar relacionadas à capacidade fisiológica intrínseca de cada espécie em infectar e colonizar as raízes e absorver e translocar os nutrientes (Balota et al., 1999).

4.2. Avaliação da promoção de crescimento vegetal

O estudo mostrou que apesar de não ter ocorrido diferença significativa na taxa de sobrevivência quando as plantas foram inoculadas com as BPCPs + FMA, os resultados mostraram uma tendência de aumento na taxa de sobrevivência quando as plantas foram inoculadas com a estirpe BR 11175 + FMA (*Herbaspirillum seropedicae*), tendo em vista que houve um incremento nas plantas de 24% em relação à TN + FMA. Sobreviveram em média 79% das plantas oriundas da cultura de tecido. A principal causa de mortalidade dessas plantas no campo ocorreu devido ao ataque de formigas. Nas Américas e no Brasil é comum encontrar formigas cortadoras de folhas, pertencentes aos gêneros *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns) se alimentando da mandioca (Bellotti and Schoonhoven, 1978). Essas formigas podem desfolhar totalmente as plantas quando ocorrem em altas populações e os ataques delas geralmente ocorrem durante os primeiros meses de desenvolvimento da cultura. Quando em elevado número podem diminuir a atividade fotossintética e, conseqüentemente, menores rendimentos (Bellotti et al. 1983).

Quanto à altura e diâmetro de plantas micropropagadas de mandioca não existem relatos de estudos em campo, no entanto Ferreira et al. (2009), avaliando a altura de plantas de mandioca propagadas vegetativamente aos 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses e 10 meses, verificaram alturas de 19,10 cm, 52,16 cm, 73,95 cm, 86,58 e 106,80 cm, respectivamente, porém segundo Carvalho and Fukuda (2006), a altura e diâmetro são variáveis que estão relacionadas com o cultivar.

Com relação ao índice de colheita (IC), os valores obtidos nesse estudo ficaram entre 52,20% e 46,28% e, foram semelhantes aos observados por Cardoso Júnior et al. (2005), que avaliando o efeito do nitrogênio em duas variedades de mandioca (Lisona e Sergipe) aos 12 meses, verificaram um IC de 53,9% e 43,3%, respectivamente. Para Conceição (1983), o IC é considerado adequado quando está acima de 60%, no entanto, ele isoladamente, não fornece informações relevantes sobre o desenvolvimento e produção da planta de mandioca, pois altos valores desse índice podem ser obtidos com o aumento da produção de raízes ou pela diminuição da produção de parte aérea (Cardoso Júnior et al., 2005).

Os baixos RMSPA e RMSR observados nesse experimento podem ser decorrentes das plantas serem oriundas do cultivo de meristemas, tendo em vista que, no geral, plantas micropropagadas apresentam menor tamanho. Além disso, de acordo com Cock (1985), algumas espécies e genótipos de mandioca podem apresentar na 1ª geração após o cultivo *in vitro*, diminuição no rendimento.

Comumente, a micropropagação em mandioca é utilizada na conservação *in vitro* de germoplasma e no melhoramento genético. No entanto, a propagação clonal massiva para a produção de manivas-sementes isentas de doenças em um curto período de tempo, tem se tornado recentemente uma estratégia, a curto prazo, para a reabilitação de cultivares locais e de uso tradicional em regiões carentes dos trópicos (Souza et al., 2009).

Quanto ao teor de amido, os valores observados estão dentro da faixa mínima requerida para a venda de raízes para indústria, que está próximo 29,71% (Cereda and Vilpoux, 2003). De acordo com Fukuda and Saad (2001) os teores de amido ou fécula estão altamente correlacionados com a matéria seca nas raízes, dependendo da variedade, do local onde se cultiva, da idade das plantas e época de colheita das raízes.

4.3. Nitrogênio e fósforo acumulado na matéria seca da parte aérea e nas raízes e porcentagem de proteína bruta na parte aérea.

O estudo mostrou que o valor médio de N acumulado na matéria seca parte aérea $N_{ac}MSPA$ (33,87 kg/ha) está entre os valores observados por Souza et al. (2006) que, avaliando 3 variedades de mandioca, do 3º ao 13º.mês, observaram que o acúmulo de N na parte aérea da mandioca aos 6 meses variou de 30 a 57 kg/ha. Essa falta de resposta da planta hospedeira pode estar relacionada às condições ambientais, visto que o solo apresentava altos teores de areia grossa, cerca de 72%, e em consequência das precipitações que ocorreram logo após o transplântio, as BPCPs ao serem re-inoculadas podem ter sido lixiviadas para camadas mais profundas do solo.

Além disso, às estirpes de BPCPs utilizadas, também interferem diretamente no sucesso da inoculação, pois, mesmo sem ter dado diferença significativa, a resposta das plantas controle (TA), revelou o potencial da composição da microbiota nativa do solo, que parece ter apresentado maior compatibilidade metabólica aos exudatos radiculares visto que, por serem mais adaptadas às condições edafoclimáticas deste estudo, podem ter promovido o deslocamento de grupos incompatíveis. De acordo com Sumner (1990), BPCPs isoladas da mesma variedade da planta que se deseja inocular, são mais eficientes, especialmente quando a população nativa está presente. Organismos adaptados às condições ambientais da região podem apresentar melhores condições para competir com a microbiota nativa, tanto pela adaptação às condições edafoclimáticas, quanto pelo aumento populacional promovido pela inoculação.

Quanto ao teor de proteína bruta (PB), o percentual médio encontrado corrobora com os encontrados por Modesto et al. (2001), que estudando a composição química de cinco cultivares de mandioca em diferentes épocas de colheita, encontraram valores que variaram de 20,7% a 38,4% para PB. Como a concentração de proteína bruta reflete os teores de N nas plantas, verificou-se que mesmo não tendo ocorrido diferenças entre os tratamentos, o percentual de PB na parte aérea da mandioca, quando inoculada com a tripla inoculação S 30 + BR 11284 + BR 11175 (*Streptomyces sp* + *G. diazotrophicus* + *Herbaspirillum seropedicae*) + FMA, revelou uma maior tendência em absorver esse elemento, visto que, promoveu um desempenho de 24,4% e 13% superior a testemunha absoluta (TA) e a planta que recebeu a aplicação de 45, kg de N ha⁻¹, respectivamente. Sugerindo estudos que avaliem o potencial dessas estirpes na melhoria do valor nutritivo da mandioca, visto que sua parte aérea também é utilizada como forragem para os animais.

Em relação ao N acumulado na matéria seca da raiz (N_{ac}MSR), verificou-se que o comportamento diferenciado promovido pela tríplice inoculação (S 30 + BR 11284 + BR 11175) + FMA, pode ser atribuído a uma combinação de mecanismos promovidos por estas estirpes, uma vez que estudos já evidenciaram que os benefícios promovidos pelas BPCPs estão além da capacidade de fixar nitrogênio e transferir nutrientes (Ahmad et al., 2008). Em interações entre leguminosas-rizóbio-FMA, tem se verificado efeitos sinérgicos, em que as leguminosas aumentam a fixação do N, principalmente devido ao fornecimento de fósforo (P) extra pelo fungo, pois esse nutriente é limitante ao desenvolvimento da planta e imprescindível à nodulação e a FBN. Além disso, o FMA requer quantidades importantes de N para o seu metabolismo (Reis et al., 2010). Dessa forma, sugere-se que essas estirpes, quando combinadas, ofereceram vantagens distintas, tendo em vista que alguns micro-organismos na rizosfera são mais susceptíveis de competir mais fortemente por compostos nitrogenados do que outros (Hodge et al., 2000).

Quanto aos teores de fósforo na matéria seca da parte aérea (PMSPA) e na matéria seca raiz (PMSR) do cv. “BRA Pretinha III”, os resultados demonstraram que os fungos micorrízicos autóctones tiveram acesso às mesmas fontes de P no solo que o *Glomus clarum*, tendo em vista que a testemunha absoluta (TA) não diferiu dos tratamentos TN + *G. clarum* e BPCPs + *G. clarum*. Além disso, o *G. clarum*, mesmo sendo inoculado antecipadamente no período de aclimatização, não mostrou capacidade competitiva e nem eficiência simbiótica elevada quando em campo. Isso pode estar relacionado com a agressividade e compatibilidade dos fungos nativos com a planta

hospedeira, visto que a área do estudo é utilizada há uma década como banco de germoplasma de mandioca.

5. Conclusões

As estirpes de bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs) inoculadas na mandioca cv. “BRA Pretinha III” influenciaram a colonização micorrízica e o número de glomerosporos. O cultivar “BRA Pretinha III” micropropagada apresentou uma baixa produtividade, sugerindo ser devido ao cultivo na primeira geração. Os teores de amido na mandioca cv. “BRA Pretinha III” foram satisfatórios para os valores requeridos pela indústria. A dose aplicada do fertilizante nitrogenado não contribuiu na otimização da mandioca cv. “BR Pretinha III” em nenhuma variável avaliada, inferindo baixo custo econômico e ecológico com a aplicação dos micro-organismos. A mix dos fungos, identificados na área de estudo, devem ser isolados e multiplicados para serem utilizados como inóculo em futuras pesquisas, assim como potencializar estudos com novas formulações de insumos biológicos para a mandioca, visando incrementar a produtividade dessa cultura em condições de micropropagação e/ou propagação em campo.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq), Brasil, a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), a Universidade Estadual de Alagoas (UNEAL), Brasil e o Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Brasil, pelo apoio financeiro à pesquisa.

Referências

- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M., 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research*. 163, 173-181.
- Andreola, F., 1982. Micorriza MVA em cana-de-açúcar. Piracicaba: USP-ESALQ, 74p. Tese de Mestrado.

- Bagyaraj, D.J., Menge, J.A., 1978. Interaction between VA mycorrhizae and *Azotobacter* and their effects on rhizosphere microflora and plant growth. *New Phytologist*. 80, 567-573.
- Balota, E. L., Lopes, E. S., Hungria, M., Döbereiner, J., 1999. Ocorrência de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34, 1265-1276.
- Balota, E.L., Lopes, E.S., Hungria, M., Döbereiner, J., 1997. Inoculação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos-arbusculares na cultura da mandioca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 32, 627-639.
- Bashan, Y., DE-Bashan, L.E., 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. *Advances in Agronomy* 108, 77-136.
- Bellotti A.C., Schoonhoven, A.V., 1978. Mites and insect pests of cassava. *Annual Review of Entomology* 23, 39-67.
- Bellotti, A.C., Vargas, O., Pena, J.E., Arias, B., 1983. Perdas em rendimento em yuca causada por insectos.y.acaros. In.: Reyes, J.A. .Yuca-. *Contr.ol.integrado de plagas. PENUD/CIAT*, 115-127.
- Beltrão, B.A., Mascarenhas, J.C., Miranda, J.L.F., Souza JR., L.C.,Galvão, M.J.T.G., Pereira, S.N., 2005. Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea no Estado de Pernambuco - Diagnóstico do Município de Arcoverde. Recife, Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais (CPRM), 11p.
- Bethlenfalvai, G.J., Cantrell, I.C., Mihara, K.L., Schreiner, R.P., 1999. Relationships between soil aggregation and mycorrhizae as influenced by soil biota and nitrogen nutrition. *Biology and Fertility of Soils* 28, 356-363.
- Bianciotto, V., Genre, A., Jargeat, P., Lumini, E., Becard, G., Bonfante, P., 2004. Vertical transmission of endobacteria in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* through generation of vegetative spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3600-3608.
- Blaszkowski, J., 2012. *Glomeromycota*. Polish Academy of Sciences, Krakow.
- Bonfante, P.; Anca, I., 2009. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual Review of Microbiology* 63, 363-383.
- Burns, A.E., Gleadow, R.M., Zacarias, A.M., Cuambe, C.E., Miller, R.E.; Cavagnaro T.R., 2012. Variations in the chemical composition of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaves and roots as affected by genotypic and environmental variation. American Chemical Society. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 4946-4956.
- Canteri, M.G., Althaus, R.A., Virgens Filho, J.D., Giglioti, E.A., Godoy, C.V., 2001. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. *Revista Brasileira de Agrocomputação*, 1, 18-24.

Cardoso Júnior, N.S.; Viana, A.E.S.; Matsumoto, S.N.; Sedyama, T.; Carvalho, F.M., 2005. Efeito do nitrogênio em características agrônômicas da mandioca. *Bragantia* 64, 651-659.

Carrenho, R., Costa, S.M.G., Balota, E.L., Colozzi Filho, A., 2010. Fungos micorrízicos arbusculares em agroecossistemas brasileiros In: Siqueira, J.O., Souza, F.A., Cardoso, E.J.B.N., Tsai, S.M., *Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil*. Lavras, Editora UFLA, 215-250.

Carvalho, L.C., Dennis, P.G., Fan, B., Fedoseyenko, D., Kierul, K., Becker, A., Von Wieren, N., Borriss, R., 2013. Linking plant nutritional status to plant-microbe interactions. *PLOS One* 8, e68555.

Carvalho, P.C.L. de., Fukuda, W.M.G., 2006. Estrutura da planta e morfologia. In: Souza, L.S., Farias, A.R.N., Mattos, P.L.P., Fukuda, W.M.G. (Eds.) *Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca*. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 126-137.

Carvalho, T.S., Moreira, F.M.S., 2010. Simbioses tripartites. Leguminosas, fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas. Sinalização e transdução de sinais em micorrizas arbusculares. In: Siqueira, J.O., Souza, F.A. de., Cardoso, E.J.B. N., Tsai, S.M. (Ed.). *Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil*. Lavras: UFLA, 119-132.

Cereda, M.P., Vilpoux, O.F., 2003. Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas, amiláceas Latino Americanas. Série: culturas Tuberosas, amiláceas Latino Americanas- v. III. São Paulo, Fundação Cargill, 711p.

Cock, J.H., 1985. Some factors in successful cropping. 9. Cassava. *SPAN*, v.28, p.23-25.

Colozzi Filho, A., Nogueira, M.A., 2007. Micorrizas arbusculares em plantas tropicais: café, mandioca e cana-de-açúcar. In: Silveira, A.P.D.; Freitas, S.S. (Ed.). *Microbiota do solo e qualidade ambiental*. Campinas: Instituto Agrônomo, 312p.

Conceição, A.J., 1983, *A mandioca*. São Paulo: Nobel, 382p.

Cruz, A.F., Ishii, T., 2011. Arbuscular mycorrhizal fungal spores host bacteria that affect nutrient biodynamics and biocontrol of soilborne plant pathogens. *Biology Open* 000, 1-6.

Duponnois, R.; Garbaye, J., 1990. Some mechanisms involved in growth stimulation of ectomycorrhizal fungi by bacteria. *Canadian Journal of Botany* 68, 2148-2152.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária., 2013. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Brasília: Embrapa Produção de informação; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 3 ed. 353p.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária., 2009. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília, DF, Embrapa Informação Tecnológica, 627p.

Fagbola, O., Osonubi, O., Mulongoy, K., 1998. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi and hedgerow trees to the yield and nutrient uptake of cassava in an alley-cropping system. *The Journal of Agricultural Science* 131, 79-85.

FAO. Food and agriculture organization of the united nations statistics. Área colhida, rendimento e produção nos principais países produtores de mandioca. Disponível em <http://faostat.fao.org>.>Acesso dia 20/05/2014.

Ferreira, A.L., Silva, A.F., Pereira, L.G.R., Braga, L.G.T., Moraes, S.A., Araújo, G.G.L., 2009. Produção e valor nutritivo da parte aérea da mandioca, maniçoba e pornunça. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 10, 129-136.

Figueiredo, M.V.B., Burity, H.A., Martinez, C.R., Chanway, C.P., 2008. Alleviation of water stress effects in cammom bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation *Paenibacillus x Rhizobium tropici*. *Applied Soil Ecology* 40, 182-188.

Fukuda, W.M.G., Cavalcanti, J., Oliveira, S.L., Delalibera, I., Jr., Iglesias, C., Caldas, R.C., 1997a. Efeito do estresse hídrico e do ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*) sobre variedades de mandioca no semi-árido. *Revista Brasileira de Mandioca* 16, 61-71.

Fukuda, W.M.G.; Saad, N., 2001. Pesquisa participativa em melhoramento de mandioca com agricultores do Nordeste do Brasil. Cruz das Almas, BA. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Documentos, 100. 48p.

Fukuda, W.M.G., Silva, S. O de., Porto, M.C.M., 1997b. Caracterização e avaliação de germoplasma de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Cruz das Almas, BA: EMBRAPA-CNPMPF, 161p.(Catalogo).

Garbaye, J., 1994. Helper Bacteria - A new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*. 128, 197-210.

Gerdemann, J.W., Nicolson, T.H., 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting. *Trans. British Mycological Society* 46, 235-244.

Gomes, J.C., Silva, J., 2006. Correção da acidez e adubação. In: Souza, L.S., Farias, A.R.N., Mattos, P.L.P., Fukuda, W.M.G. Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 215-247.

Gopal, S., Chandrasekaran, M., Shagol, C., Kim, K., Sa, T., 2012. Spore Associated Bacteria (SAB) of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) and Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) Increase Nutrient Uptake and Plant Growth Under Stress Conditions. *Journal of Soil Science and Fertilizer* 45, 582-592.

Grossmann, J., Freitas, A.C., 1950. Determinação do teor de matéria seca pelo peso específico em raízes de mandioca. *Revista Agrônômica* 14, 75-80.

Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950. The water culture method for growing plants without soils. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p.

Hodge, A., Robinson, D., Fitter, A., 2000. Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen?. *Trends in plant science* 5, 304-308.

HORII, S., ISHII, T., 2006. Identification and function of *Gigaspora margarita* growth-promoting microorganisms. *Symbiosis* 41, 135-141.

Howeler, R.H., Sieverding, E.; Saif, S., 1987. Practical aspects of mycorrhizal technology in some tropical crops and pastures. *Plant and Soil* 100, 249-283.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento sistemático da produção agrícola.-2013. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatística/indicadores/agropecuária/Ispa/Ispa_201404 >Acesso dia 20/05/2014.

Jarstfer, A.G., Sylvia, D.M, 1992. Inoculum production and inoculation strategies for vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. In: Blaine Meeting Jr., F. (ed.). *Soil Microbial Ecology. Application in Agricultural and Environmental Management*. Marcel Dekker, New York. 349-369.

Jenkins, W.R., 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* 48, 629.

Modesto, E.C., Santos, G.T., Vidigal Filho, P.S., Zambom, M.A., Vilela, D., Jobim C.C., Faria, K.P., Detmann, E., 2001. Composição química das folhas de cinco cultivares de mandioca (*Manihot Esculenta*, Crantz) em diferentes épocas de colheita. 38º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. . In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 38ª, 2001, Piracicaba, SP, Anais..., Piracicaba: SBZ, 1033-1034.

Moreira, F.S., Campos, C.R.A., 2013. Micro-organismos. In: Moreira, F.S., Cares, J.E., Zanetti, R., Stümer, S.L. *O ecossistema do solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal*. Lavras: Ed. UFLA, 201-221.

Morton, J.B., Bentivenga, S.P., Wheeler, W.W., 1993. Germ plasm in the International Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. *Mycotaxon* 48, 491-528.

Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.

Nicolson, T.H., Schenck, N.C., 1979. Endogonaceous mycorrhizal endophytes in Florida. *Mycologia* 71, 178-198.

Otsubo, A.A., Mercante, F.M., Silva, R.F. da., Borges, C. D., 2008. Sistemas de preparo do solo, plantas de cobertura e produtividade da cultura da mandioca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43, 327-332.

Phillips, J.M., Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55, 157-160.

- Reis, V.M., 2004. Método de inoculação de bactérias diazotróficas em plantas de cana-de-açúcar micropropagadas. Comunidade Técnico Embrapa Agrobiologia, n.65.
- Reis, V.M., Andrade, G., Faria, S.M., Silveira, A.P.D., 2010. Interações de fungos micorrízicos com outros microrganismos do solo. In: Siqueira, J.O., Souza, F.A., Cardoso, E.J.B.N., Tsai, S.M. (org.). Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil. Lavras: UFLA, 361-382.
- Roca, W.M., Nolt, B., Mafla, G., Roa, J., Reyes, R., 1991. Eliminacion de virus y propagacion de clones en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). In: W.M. Roca & L.A. Mroginski (Eds.), Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones, CIAT, 403-420.
- Saito, M., Oba, H., Kojima, T., 2011. Effect of nitrogen on the sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing several gramineous plant species. Soil Science and Plant Nutrition 57, 29-34.
- Santos, C.E.R.S., Freitas, A.D.S., Vieira, I.M.M.B., Colaço, W., 2008. Fixação do N₂ em leguminosas tropicais. In: Figueredo, M.V.B., Burity, H.A., Santos, C.E.R.S. (Eds) Microbiologia e agrobiodiversidade: O novo desafio para agricultura. Guaíba: Agrolivros, 17-41.
- Schenck, N.C., Pérez, Y., 1990. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. 3.ed. Gainesville: Synergistic Publications.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., Walker, C., 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. Mycological Research 105, 1413-1421.
- Sieverding, E., 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agroecosystems. GTZ, Eschborn. 371p.
- Silva, A.D.A., Santos, E.O.S. Cultura da mandioca. Publicações/Folhetos explicativos. Disponível em: < <http://www.ipa.br/resp14.php> >, Acesso em: 04 de abril de 2014.
- Silveira, J.A.G., Contado, J.L., Mazza, J.L.M., Oliveira, J.T.A., 1998. Phosphoenolpyruvate carboxylase and glutamine synthetase activities in relation to nitrogen fixation in cowpea nodules. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 10, 9-23.
- Soares, S.A.G., Mariano, R.L.R., Cavalcante, U.M.T., Maia, L.C., 2009. Efeito de bactérias na germinação de fungos micorrízicos arbusculares e co-inoculação em mudas de abacaxizeiro. Revista Caatinga 22, 31-38.
- Souza, L.D., Souza, L.S., Gomes, J.C., 2006. Exigências edáficas da cultura da mandioca. In: Souza, L.S., Farias, A.R.N., Mattos, P.L.P., Fukuda, W.M.G. (Ed.). Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 70-214.
- Souza, A. da S., Junghans, T.G., Souza, F.V.D., Santos-Serejo, J.A. dos; Silva Neto, H.P. da; Menezes, M.C., Silveira, D.G., Santos, V. da S., 2009. Micropropagação da mandioca. In: Junghans, T.G., Souza, A. da S. (Ed.). Aspectos práticos da

micropropagação de plantas. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 323-349.

Stümer, S.L., Siqueira, J.O., 2013. Fungos micorrízicos. In: Moreira, F.S., Cares, J.E., Zanetti, R., Stümer, S.L. O ecossistema do solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal. Lavras: Ed. UFLA, 289-310.

Sumner, M.E., 1990. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. *Advances in Soil Sciences* 12, 54-123.

Teixeira, M.A., Melo, I.S., Vieira, R.F., Costa, F.E.C.; Harakava, R., 2007. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. *pesquisa agropecuária brasileira* 42, 43-49.

Watanabe, F.S., Olsen, S.R., 1965. Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO₃ extracts from soil. *Soil Science Society of America Proceedings* 29, 677-678.

Xavier, L.J.C., Germida, J.J., 2003. Selective interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* enhance pea yield and nutrition. *Biology and Fertility of Soils* 37, 262-267.

Tabelas

Tabela 1. Colonização micorrízica e número de glomerosporos de plantas micropropagadas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cv. (BRA Pretinha III) avaliadas aos 203 dias após o plantio em relação à inoculação de BPCPs e *Glomus clarum*.

Tratamentos	Colonização micorrízica (%)	¹ Nº de glomerosporos 50 g solo ⁻¹
S 30 + FMA	80,75 ab	129,50 b
BR 11175 + FMA	80,75 ab	293,50 a
BR 11284 + FMA	72,25 b	78,00 bc
S 30 + BR 11175 + FMA	82,75 ab	61,50 c
S 30 + BR 11284 + FMA	84,75 a	57,75 c
BR 11284 + BR 11175 + FMA	86,25 a	73,50 bc
S 30 + BR 11284 + BR 11175 + FMA	88,00 a	48,50 c
TN + FMA	80,75 ab	35,75 c
TA+FMA	81,25 ab	41,50 c
TA	80,25 ab	37,25 c
Média	81,78	85,68
CV (%)	6,07	15,48

Médias seguidas pela mesma letra minúscula dentro da mesma coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284), *Streptomyces sp* (S 30), Testemunha nitrogenada (TN) e Testemunha absoluta (TA). ¹Para a análise estatística, os dados de glomerosporos foram transformados em raiz de (x). Médias de 4 repetições.

Tabela 2. Taxa de sobrevivência (TS), diâmetro do caule (DC) e altura de plantas (AP) micropropagadas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cv. (BRA Pretinha III) inoculadas com BPCPs e *Glomus clarum* aos 203 dias após o plantio em um solo Espodossolo Cárstico Órtico.

Tratamentos	Sobrevivência		Diâmetro		Altura	
	%		mm		cm	
S30 + FMA	75,00	a	18,63	a	53,64	a
BR 11175 + FMA	85,40	a	18,35	a	52,00	a
BR 11284 + FMA	83,30	a	17,71	a	51,90	a
S30 + BR 11175 + FMA	77,07	a	19,35	a	56,30	a
S30 + BR 11284 + FMA	77,07	a	17,43	a	48,25	a
BR 11284 + BR 11175 + FMA	83,35	a	18,69	a	50,20	a
S30 + BR 11284 + BR 11175 + FMA	83,32	a	18,18	a	52,15	a
TN + FMA	68,75	a	17,74	a	54,91	a
TA+FMA	79,17	a	17,02	a	50,19	a
TA	81,22	a	18,17	a	53,41	a
Média	79,37		18,13		52,29	
CV	9,94		7,30		8,99	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre os tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284), *Streptomyces sp* (S 30), Testemunha nitrogenada (TN), Testemunha absoluta (TA).¹FMA (Fungo micorrízico arbuscular). Médias de 4 repetições.

Tabela 3. Índice de colheita (IC), rendimento matéria seca parte aérea (RMSPA), rendimento matéria seca raiz (RMSR) e teor de amido (Tamido) de plantas micropropagadas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cv. (BRA Pretinha III) inoculadas com BPCPs e *Glomus clarum* aos 203 dias após o plantio em um Espodossolo Cárstico Órtico.

Tratamentos	IC %	RMSPA kg ha ⁻¹	RMSR	Tamido %
S30 + FMA	50,66 a	917,24 ab	691,67 a	29,29 a
BR 11175 + FMA	48,82 a	1081,03 ab	764,08 a	28,58 a
BR 11284 + FMA	47,63 a	857,18 ab	608,19 a	28,02 a
S30 + BR 11175 + FMA	50,03 a	988,22 ab	719,83 a	28,73 a
S30 + BR 11284 + FMA	46,28 a	753,45 b	405,32 a	27,83 a
BR 11284 + BR 11175 + FMA	49,09 a	906,32 ab	706,32 a	27,88 a
S30 + BR 11284 + BR 11175 + FMA	48,76 a	949,99 ab	757,18 a	27,74 a
TN + ¹FMA	47,86 a	1195,69 a	771,98 a	28,02 a
TA + FMA	48,38 a	1010,06 ab	763,07 a	27,74 a
TA	52,20 a	990,04 ab	645,10 a	27,74 a
Média	48,97	964,9	683,26	28,16 a
CV (%)	9,90	17,13	29,89	5,16

Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre os tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284), *Streptomyces sp* (S 30), Testemunha nitrogenada (TN), Testemunha absoluta (TA).¹FMA (Fungo micorrízico arbuscular). Médias de 4 repetições.

Tabela 4. Nitrogênio acumulado na matéria seca da parte aérea ($N_{ac}MSPA$), proteína bruta (PB), nitrogênio acumulado na matéria seca raiz ($N_{ac}MSR$), teor de fósforo na matéria seca parte aérea (PMSPA), teor de fósforo na matéria seca raiz (PMSR) em plantas micropropagadas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cv. (BRA Pretinha III) inoculadas com BPCPs e *Glomus clarum* aos 203 dias após o plantio em um Espodossolo Cárstico Órtico.

Tratamentos	$N_{ac}MSPA$ kg ha ⁻¹	PB %	$N_{ac}MSR$ kg ha ⁻¹	PMSPA g P/kg MS	PMSR
S30 + FMA	28,46 a	32,71 a	3,78 abc	3,41 ab	2,44 a
BR 11175 + FMA	38,91 a	34,53 a	4,03 abc	3,33 ab	2,31 a
BR 11284 + FMA	29,63 a	37,66 a	3,56 abc	3,42 ab	2,29 a
S30+BR 11175 + FMA	33,25 a	36,25 a	4,30 abc	3,46 ab	2,52 a
S30+BR 11284 + FMA	28,42 a	39,90 a	2,83 c	3,49 a	2,52 a
BR 11284+BR 11175 + FMA	33,22 a	36,41 a	3,03 bc	3,48 a	2,39 a
S30 + BR 11284 + BR 11175 + FMA	31,14 a	40,63 a	5,14 a	3,46 ab	2,58 a
TN + ¹FMA	43,92 a	35,94 a	4,55 ab	3,42 ab	2,33 a
TA + FMA	36,48 a	36,66 a	4,76 a	3,39 ab	2,36 a
TA	33,25 a	32,66 a	3,44 abc	3,38 ab	2,57 a
Média	33,87	36,34	3,94	3,43	2,43
CV (%)	19,60	15,01	17,89	1,73	11,31

Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre os tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11175), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11284), *Streptomyces sp* (S 30), Testemunha nitrogenada (TN), Testemunha absoluta (TA). ¹FMA (Fungo micorrízico arbuscular). Médias de 4 repetições.

Figuras

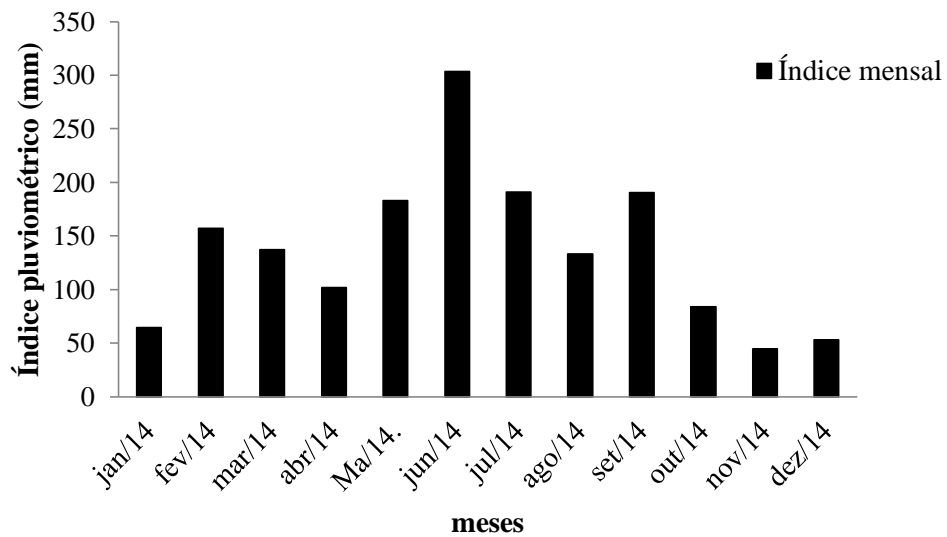


Figura 1. Precipitações mensais ocorridas durante o experimento Interrelação BPCP e *Glomus clarum* em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) micropropagadas no Espodossolo. Fonte: Estação meteorológica de Itapirema-IPA/Goiana/PE.

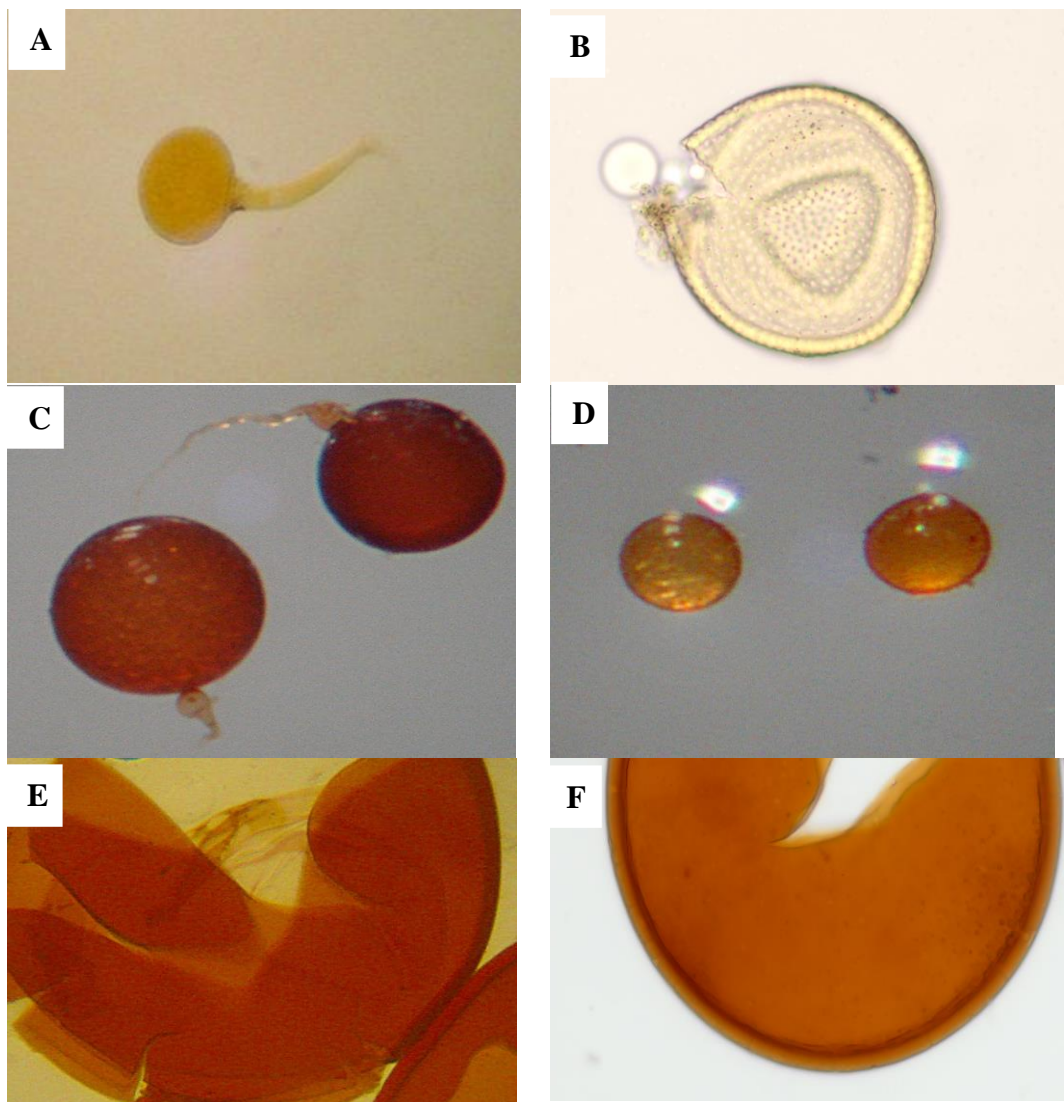


Figura 2. Fotomicrografia dos esporos de FMA presentes na área de estudo (Estação Experimental de Itapirema- IPA) aos 200 DAP de plantas micropropagadas de mandioca (cv. BRA Pretinha III). (A) e (B) *Acaulospora sp.*, (C) *Scutellospora sp.*, (D) *Glomus sp.*, (E) *Fuscitata sp.*, (F) *Gigaspora sp.* Aumento de 40x.

ANEXO

Marcia Barreto

De: em.tjom.0.413595.f465a7ae@editorialmanager.com em nome de Journal of Microbiology Editorial Office <em@editorialmanager.com>
Enviado em: segunda-feira, 16 de fevereiro de 2015 06:28
Para: Marcia Figueiredo
Assunto: TJOM: A manuscript number has been assigned to Acclimatization of inoculated seedlings of Manihot esculenta Crantz in vitro with plant growth-promoting bacteria

Dear PhD Figueiredo,

Your submission entitled "Acclimatization of inoculated seedlings of Manihot esculenta Crantz in vitro with plant growth-promoting bacteria" has been assigned the following manuscript number: TJOM-D-15-00088.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://tjom.edmgr.com/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office
Journal of Microbiology

car

Buscar no Mail Buscar na Web Início esmeralda a...

Apagar Mover Spam Mais Recolher

[JAS] Submission Acknowledgement(2) Pessoas

Marcia Barreto Hoje em 4:25 PM

Para eportolopes@yahoo.com.br

-----Mensagem original-----
De: Anne Brown [mailto:jas@ccsenet.org]
Enviada em: domingo, 19 de abril de 2015 16:16
Para: Marcia Figueiredo
Assunto: [JAS] Submission Acknowledgement

Dear Marcia Figueiredo,

Thank you for submitting the manuscript, "Co-inoculation of growth promoting bacteria in plants and *Glomus clarum* in micropropagated *Manihot esculenta* Crantz" to Journal of Agricultural Science. With the online journal management system that we are using, you will be able to track its progress through the editorial process by logging in to the journal web site:

Manuscript URL:
<http://www.ccsenet.org/journal/index.php/jas/author/submission/47714>
Username: marciafigueiredo

If you have any questions, please contact me. Thank you for considering this journal as a venue for your work.
Best Regards,

Anne Brown
Editorial Assistant, Journal of Agricultural Science Canadian Center of Science and Education

1120 Finch Avenue West
Suite 701-309
Toronto, ON., M3J 3H7
Canada
Tel: 1-416-642-2606 ext.205
Fax: 1-416-642-2608
E-mail: jas@ccsenet.org
URL: <http://www.ccsenet.org/jas>

Responder, Responder a todos ou Encaminhar | Mais

Esmeralda Hoje em 5:45 PM

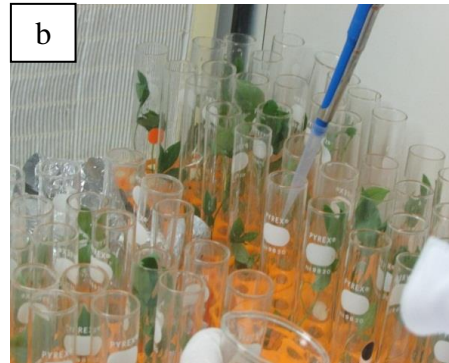
Obrigado por nos ajudar a melhorar a sua experiência no Yahoo



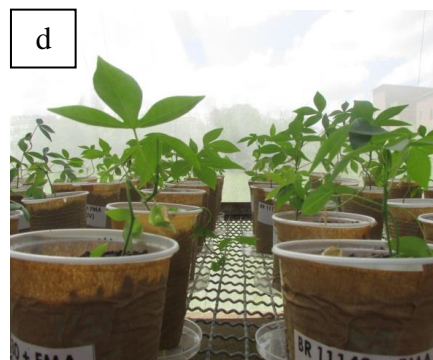
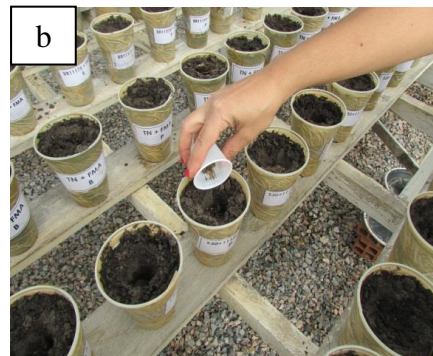
Anexo 3. Multiplicação do *Glomus clarum* usando como planta hospedeira o painço (*Panicum miliaceum* L.)



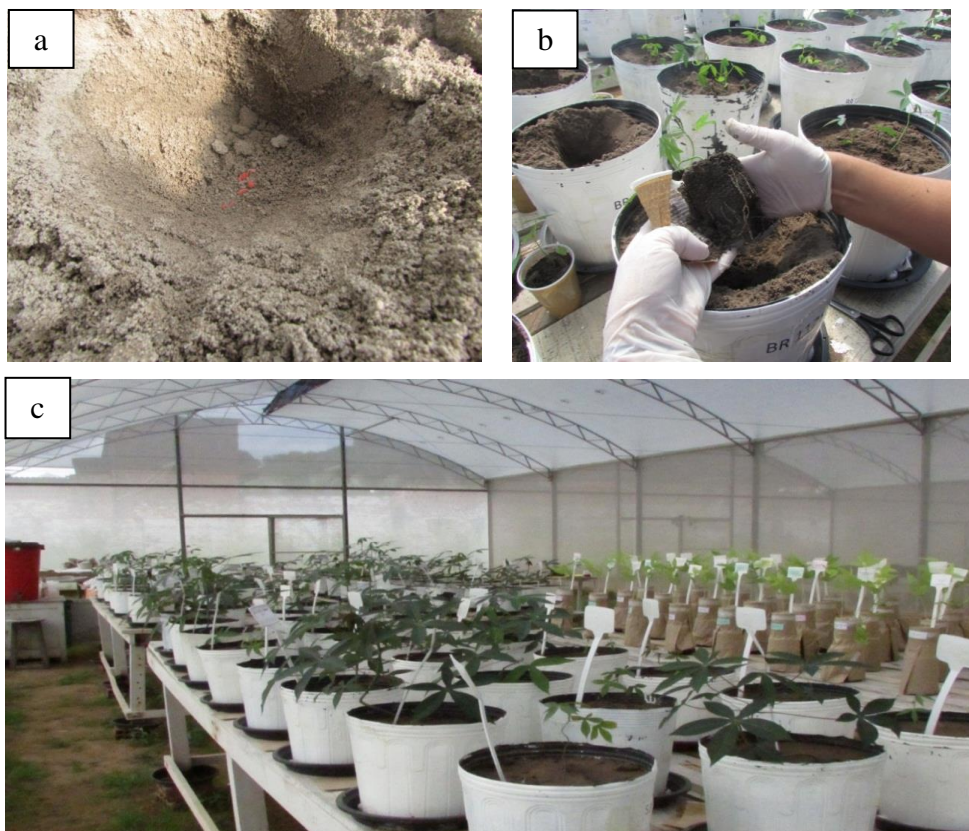
Anexo 4. Plantio das manivas (a), extração dos brotos (b), estabelecimento dos meristemas (c), multiplicação (d).



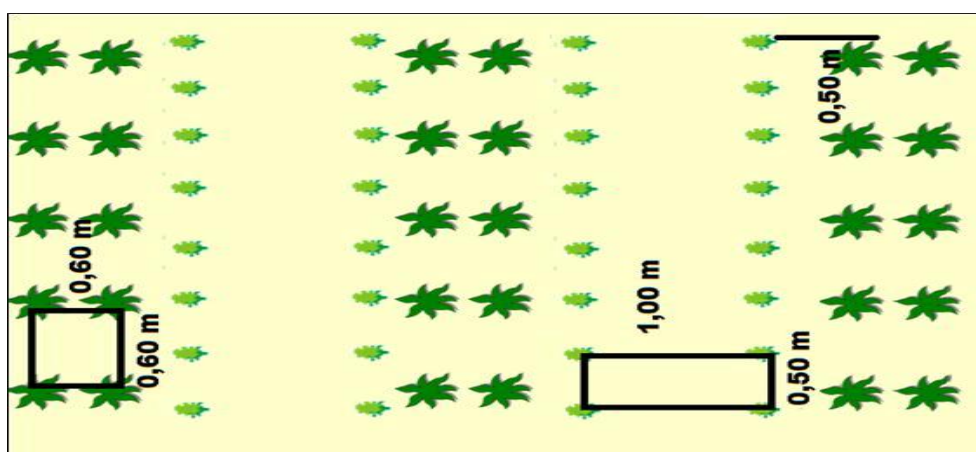
Anexo 5. Corte das raízes (a) e inoculação das BPCPs (b).



Anexo 6. Lavagem das raízes (a), inoculação do solo-inóculo (b), cobertura com copo descartável (c), retirada do copo descartável aos 20 DAP (d)



Anexo 7. Adubação de acordo com a análise química do solo (a), transplante para os vasos de 8 kg de solo Espodossolo (b) e vista geral do experimento Co-inoculação bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Glomus clarum* em *Manihot esculenta* Crantz micropropagada aos 66 DAP (c).



Anexo 8. Modelo da parcela experimental representando o consórcio entre a mandioca e mucuna-preta no experimento Interrelação BPCP e *Glomus clarum* em *Manihot esculenta* Crantz no Espodossolo.



Anexo 9. Plantio das mudas (a e b), inoculação sementes de mucuna- preta (c), mistura (d), aplicação de solução açucarada (e), plantio das sementes (f)



Anexo 10. Acondicionamento dos inoculantes (a) e reinoculação das estirpes bacterianas (b) no experimento Interrelação BPCP e *Glomus clarum* em *Manihot esculenta* Crantz no Espodossolo.



Anexo 11. Vista geral do experimento Interrelação BPCP e *Glomus clarum* em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) micropropagadas no Espodossolo no dia da coleta.