

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE ENGENHARIA**

**CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

**JULIANA SILVA RODRIGUES CABRAL**

**ACLIAMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS MICROPROPAGADAS E PRODUÇÃO DE  
MUDAS DE MANGABEIRA UTILIZANDO MICRORGANISMOS PROMOTORES  
DO CRESCIMENTO**

Ilha Solteira  
2016

**JULIANA SILVA RODRIGUES CABRAL**

**ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS MICROPROPAGADAS E PRODUÇÃO DE  
MUDAS DE MANGABEIRA UTILIZANDO MICRORGANISMOS PROMOTORES  
DO CRESCIMENTO**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia do  
Campus Ilha Solteira – UNESP como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Doutor em  
Agronomia. Especialidade: Sistemas de Produção.

**Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Maria Rodrigues Cassiolato**

Orientadora

**Prof<sup>o</sup> Dr. Edson Luiz Souchie**

Co-Orientador

**Dra. Flávia Dionísio Pereira**

Co-orientadora

Ilha Solteira  
2016

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Aclimatização de plântulas micropropagadas e produção de mudas de mangabeira utilizando microrganismos promotores do crescimento.

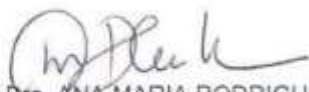
AUTORA: JULIANA SILVA RODRIGUES CABRAL

ORIENTADORA: ANA MARIA RODRIGUES CASSIOLATO

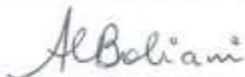
CO-ORIENTADOR: EDSON LUIZ SOUCHIE

CO-ORIENTADORA: FLÁVIA DIONÍSIO PEREIRA

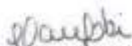
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA, especialidade: SISTEMAS DE PRODUÇÃO pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ANA MARIA RODRIGUES CASSIOLATO  
Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira



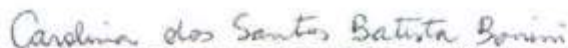
Profa. Dra. APARECIDA CONCEICAO BOLIANI  
Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira



Profa. Dra. PAULA FABIANE MARTINS  
Polo de Inovação em Bioenergia e Grãos / Instituto Federal Goiano



Profa. Dra. LUCIANA CRISTINA VITORINO  
Instituto Federal Goiano



Profa. Dra. CAROLINA DOS SANTOS BATISTA BONINI  
Coordenadoria de Curso de Engenharia Agrônômica / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas

Ilha Solteira, 05 de julho de 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

- C117a Cabral, Juliana Silva Rodrigues.  
Aclimatização de plântulas micropropagadas e produção de mudas de mangabeira utilizando microrganismos promotores do crescimento / Juliana Silva Rodrigues Cabral. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2016  
153 f. : il.
- Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Sistema de Produção, 2016
- Orientador: Ana Maria Rodrigues Cassiolato  
Coorientador: Edson Luiz Souchie  
Inclui bibliografia
1. Hancornia Speciosa Gomes. 2. Cerrado. 3. Micropropagação. 4. Fungos promotores do crescimento vegetal. 5. Glomus Clarum.

## AGRADECIMENTOS

De coração agradeço à minha família por estar ao meu lado ao longo dessa jornada de altos e baixos. MÃE, TATI, NANDO e meu grande amigo-irmão PAULO HENRIQUE que sempre estiveram comigo, incentivando e apoiando. Obrigada pela compreensão, carinho e amor.

A Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Maria Rodrigues Cassiolato por ter aceitado me orientar e ao longo destes anos ter tido muita paciência mesmo nos momentos de correria, sempre com profissionalismo, competência, humildade e me passando confiança.

Aos Co-orientadores Flávia Dionísio Pereira, obrigada por mostrar que posso ser sempre melhor, por chamar minha atenção sempre que necessário, exigindo de mim o máximo. E Edson Luiz Souchie, meu caro, novamente obrigada por estar comigo nesta viagem que é a microbiologia do solo, sempre demonstrando o lado positivo de tudo.

Aos amigos de todas as horas, Paula Sperotto (agora é Faria), Laiany, Marialva, Clarice e Apolyana. E aos novos amigos, Antonio Flávio e Belisa, foram muitas histórias nessa Ilha Solteira.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia Agrícola, obrigada por tudo, pelas risadas, apoio, e acima de tudo, por dividir comigo esse amor pela microbiologia do solo. Os Thundercats permanecem com a visão além do alcance.

Ao pessoal do Laboratório de Cultura de Tecidos vegetais – IF Goiano Campus Rio Verde: Luan, Germanna, Thainá, Mariluzia, Elisvane, Aurélio, Giselle e demais. Terei ótimas lembranças dos momentos incríveis que passei com vocês.

Ao pessoal da Fazenda Gameleira: Bethânia, Bheatriz, Geraldo, Doraci, Geraldin, Márcio Alexandre, Danilo, Seu João, Dona Lurdinha e Dona Maria, obrigada pela ajuda nas coletas de fruto, hospitalidade e risadas.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Ilha Solteira pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia e estrutura.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde pela infraestrutura.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de Doutorado e apoio financeiro concedido para a realização do projeto através do processo 2012/14489-9.

Obrigada a todos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) se destaca entre as árvores frutíferas nativas do cerrado como uma das mais promissoras para programas de exploração sustentável. Apesar do potencial econômico, a falta de informações sobre esta cultura vem restringindo seu cultivo comercial. A propagação sexuada desta espécie é dificultada, pois suas sementes têm curta longevidade e a redução do teor de água prejudica sua viabilidade e vigor. A técnica de micropropagação possibilita a multiplicação em massa de mudas com características geneticamente superiores, uniformes, em espaço físico reduzido e curto período de tempo. Entretanto, ela elimina os microrganismos associados ao tecido vegetal, incluindo mutualistas como os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), além dos promotores de crescimento vegetal, que podem melhorar o desempenho da planta sob condições de estresse, além de aumentar o rendimento. A inoculação destes microrganismos durante a micropropagação tem sido recomendada para reduzir o tempo de formação das mudas e de aclimatização, aumentar a tolerância a estresses bióticos e abióticos, resistência a patógenos e porcentagem de sobrevivência das mudas após o transplante. Objetivou-se com este trabalho a aclimatização de plantas micropropagadas de mangabeira com diferentes substratos e câmara úmida, inoculadas com fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) *in vitro* e *ex vitro*, associados com o FMA *Glomus clarum*, em casa de vegetação, para maximizar a produção de mudas a serem utilizadas em programas de formação de pomares e reflorestamento. Os experimentos foram conduzidos na UNESP - Universidade Estadual Paulista, Campus de Ilha Solteira e Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde (IF Goiano – Campus Rio Verde). O material vegetal utilizado na propagação *in vitro* foi retirado de frutos de diferentes plantas de mangabeira coletados na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da UNESP Campus Ilha Solteira e na Fazenda Gameleira, município de Montes Claros de Goiás - GO. Todos os experimentos foram realizados e conduzidos por 120 dias. A associação do saco plástico como câmara úmida com o substrato Bioplant<sup>®</sup>, seguido da pulverização de FPCV e inoculação do *G. clarum* é o método mais adequado para aclimatização de plantas micropropagadas de mangabeira, em casa de vegetação.

**Palavras-chave** - *Hancornia speciosa* Gomes. Cerrado. Micropropagação. Fungos promotores do crescimento vegetal. *Glomus clarum*.

## ABSTRACT

Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) stands out among the native fruit trees of the Cerrado as one of the most promising for sustainable exploitation programs. Despite the economic potential, lack of information about this culture is limiting its commercial cultivation. The sexual propagation of this species is difficult as its seeds have a short longevity, and reduced water content impairs their viability and vigor. The micropropagation technique enables the mass multiplication of plants with genetically superior features, uniform, in a reduced physical space and a short length of time. However, it eliminates the microorganisms associated with plant tissue, including mutualists, as mycorrhizal fungi (AMF), in addition to plant growth promoters, which can improve plant performance under stress conditions, and increase the yield. Inoculation of these microorganisms during micropropagation has been recommended to reduce the time of seedlings formation and acclimatization, and to increase tolerance to biotic and abiotic stresses, resistance to pathogens and percentage of seedling survival after transplantation. This study aimed the acclimatization of micropropagated plants with different substrates and moister chamber, inoculated with plant growth-promoting fungi (PGPF) *in vitro* and *ex vitro*, associated with AMF *Glomus clarum*, in a greenhouse, to maximize seedlings production to be used in the mangabeira and reforestation programs. Experiments were conducted at UNESP- Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira Campus, and Federal Institute Goiano - Rio Verde Campus (IF Goiano - Campus Rio Verde). The plant material used in the *in vitro* propagation was removed from fruits of different mangabeira plants collected in Teaching, Research and Extension Farm of the UNESP Ilha Solteira Campus and Gameleira Farm, Montes Claros de Goiás-GO. All experiments were performed and conducted for 120 days. The association of plastic bag as a moist chamber with Bioplant<sup>®</sup> substrate, followed by spray PGPF and inoculation of *G. clarum* is the most appropriate method for acclimatization of micropropagated plants mangabeira in the greenhouse. The association of plastic bag as moist chamber with Bioplant<sup>®</sup> substrate, followed by spray PGPF and inoculation of *G. clarum* is the most appropriate method for acclimatization of micropropagated of mangabeira plants in the greenhouse.

**Keywords** - *Hancornia speciosa* Gomes. Cerrado. Micropropagation. Plant growth-promoting fungi. *Glomus clarum*.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1-** Isolados fúngicos solubilizadores de fosfato, obtidos de solo rizosférico próximo a raízes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). A) MA2, B) MA5, C) MF1 e D) MF3..... 39
- Figura 2-** Síntese de AIA por fungos solubilizadores de fosfato isolados de solo próximo a raízes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), ao longo de cinco dias de avaliação. .... 45

### CAPÍTULO 2

- Figura 1-** Planta matriz de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) com frutos (A) e (B), detalhe de suas flores (C), diferentes colorações e pigmentação dos frutos (D) e tamanho dos frutos (E). Barra= 10 mm. .... 58
- Figura 2-** Plantas micropropagadas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aclimatizadas em substratos: Bioplant<sup>®</sup> (A); Solo (B); Areia (C); Areia + Solo (D); Areia + Solo + Vermiculita (E); Copos plásticos como câmara úmida (F) e vasos com presença ou ausência de câmara úmida (G). Barra= 10 mm..... 59
- Figura 3-** Início da germinação das sementes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) *in vitro* (A), coloração vermelha do hipocótilo (B), início da emergência dos cotilédones foliares (C e D), cotilédones totalmente emergidos (E), primeiras folhas emergidas e presença de raízes adventícias (F), planta com 60 dias de cultivo *in vitro* (G) e com coloração vermelha no caule, característica da espécie (H). Barra= 10 mm. .... 63
- Figura 4-** Cotilédones foliares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) após o primeiro sub-cultivo (A), cotilédones com uma brotação lateral (B e C), cotilédones com duas brotações laterais (D), plantas com presença (E) e ausência de raiz adventícia (F) aos 120 dias de cultivo *in vitro*. Barra= 10 mm. .... 64
- Figura 5-** Formação de raízes em plantas micropropagadas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aclimatizadas em Bioplant<sup>®</sup>, com presença de câmara úmida, em casa de vegetação. .... 67
- Figura 6-** Plantas micropropagadas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aclimatizadas em substratos, em presença e ausência de câmara úmida, em casa de vegetação. Explantes de mangaba utilizados para a aclimatização (A). Substratos com ausência de câmara úmida: Solo (B); Areia + Solo (C); Areia + Solo +

Vermiculita (D); Bioplant<sup>®</sup> (E). Substratos com presença de câmara úmida: Areia (F); Solo (G); Areia + Solo (H); Areia + Solo + Vermiculita (I) e Bioplant<sup>®</sup> (J). Barra= 10 mm. .... 69

**Figura 7-** Plantas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aclimatizadas em ausência de câmara úmida, diferentes substratos e inoculação de fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e do fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Glomus clarum*, em casa de vegetação. Substratos Bioplant<sup>®</sup> + FMA + FPCV (A); Solo + Areia + Vermiculita + FMA + FPCV (B). Barra= 10 mm. .... 72

**Figura 8-** Plantas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aclimatizadas em presença de câmara úmida, substratos e inoculadas com fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Glomus clarum*, em casa de vegetação. Substrato Bioplant<sup>®</sup> (A); Bioplant<sup>®</sup> + FMA (B); Bioplant<sup>®</sup> + FPCV (C); Bioplant<sup>®</sup> + FMA + FPCV (D); Solo + areia + vermiculita (E); Solo + areia + vermiculita + FMA (F); Solo + areia + vermiculita + FPCV (G) e Solo + areia + vermiculita + FMA + FPCV (H). Barra= 10 mm. .... 75

### CAPÍTULO 3

**Figura 1-** Pré-aclimatização de plantas micropropagadas de mangabeira. Frascos com plantas de mangabeira no armário (A), com as tampas destravadas (B), com tampas semi-abertas (C), tampa dos frascos retirada (D) e frascos sem as tampas de polipropileno (E). .... 87

**Figura 2-** Aclimatização de plantas de mangabeira em casa de vegetação. Plantas de mangabeira após terem sido retiradas dos frascos com meio de cultivo (A e B); vasos com saco plástico (C); vasos com copo plástico (D); Vasos com os copos e sacos plásticos (E); Plantas sem os copos e sacos plásticos aos 100 dias de implantação (F). Barra= 10 mm. .... 89

**Figura 3-** Plantas aclimatizadas de *Hancornia speciosa* Gomes, em casa de vegetação. Substratos com saco plástico como câmara úmida: Areia (A); Solo (B); Bioplant<sup>®</sup> (C); Areia + Solo (D); Areia + Solo + Vermiculita (E). Substratos com copo plástico como câmara úmida: Areia (F); Solo (G); Bioplant<sup>®</sup> (H); Areia + Solo (I); Areia + Solo + Vermiculita (J). Barra= 10 mm. .... 97

**Figura 4-** Plantas de mangabeira inoculadas com fungos promotores do crescimento vegetal e fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Glomus clarum*, aclimatizadas em casa de

vegetação. FMA (A); FPCV (B); FMA + FPCV (C); Controle (D). Formação de raízes após os tratamentos de inoculação. FMA (E); FPCV (F); FMA + FPCV (G); Controle (H). Barra= 10 mm..... 101

#### CAPÍTULO 4

**Figura 1-** Inoculação *in vitro* de fungos promotores do crescimento vegetal em plantas de mangabeira. MA2 (A); MA5 (B); MF1 (C); MF3 (D) e controle (E). Plantas de mangabeira acondicionadas em sala de crescimento após inoculação (F) e aclimatização das plantas inoculadas *in vitro* (G)..... 112

**Figura 2-** Plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas *in vitro* com fungos promotores do crescimento vegetal e aclimatizadas em ausência ou presença de *Glomus clarum*, em casa de vegetação. Ausência de *G. clarum*: MA2 (A); MA5 (B); MF1 (C); MF3 (D) e controle não inoculação (E). Presença de *G. clarum*: MA2 (F); MA5 (G); MF1 (H); MF3 (I) e controle inoculado *G. clarum* (J). Barra= 10 mm..... 118

**Figura 3-** Plantas micropropagadas de mangabeira aclimatizadas com fungos promotores do crescimento vegetal e *Glomus clarum*, em casa de vegetação. Ausência de *Glomus clarum*: MA2 (A); MA5 (B); MF1 (C); MF3 (D) e sem inoculação (E). Presença de *Glomus clarum*: MA2 (F); MA5 (G); MF1 (H); MF3 (I) e *Glomus clarum* (J). Barra= 10 mm. .... 124

#### CAPÍTULO 5

**Figura 1-** Porcentagem de sobrevivência e enraizamento de plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas com fungos promotores do crescimento vegetal em diferentes dias após a aclimatização, em casa de vegetação..... 137

**Figura 2-** Plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas com fungos promotores do crescimento vegetal em diferentes dias após a aclimatização e *Glomus clarum*, em casa de vegetação. Inoculação com FPCV: 0 dias (A); 5 dias (B); 10 dias (C); 15 dias (D) e 20 dias (E). Inoculação com FMA + FPCV: 0 dias (F); 5 dias (G); 10 dias (H); 15 dias (I) e 20 dias (J). Barra= 10 mm. .... 141

**Figura 3-** Plantas micropropagadas de mangabeira aclimatizadas com diferentes métodos de inoculação de fungos promotores do crescimento vegetal em ausência ou presença de *Glomus clarum*, em casa de vegetação. Ausência de *Glomus clarum*: Inoculação próximo ao colo da planta (I) (A); Pulverização (P) (B); I + P (C); P + P (D) e sem

inoculação (E). Presença de *G. clarum*: Inoculação próximo ao colo da planta (I) (F);  
Pulverização (P) (G); I + P (H); P + P (I) e *G. clarum* (J). Barra= 10 mm..... 146

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Tabela 1-** Síntese de ácido indol acético (AIA) por fungos solubilizadores de fosfato, isolados de solo próximo a raízes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). .....45
- Tabela 2-** Comprimento médio de hipocótilos e peso da massa fresca e seca de hipocótilos de rabanete inoculados com o sobrenadante de fungos solubilizadores de fosfato, isolados de solo próximo a raízes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)...46
- Tabela 3-** Peso da massa fresca e seca de cotilédones de rabanete inoculados com o sobrenadante de fungos solubilizadores de fosfato, isolados de solo próximo a raízes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). .....47
- Tabela 4-** Avaliação qualitativa de produção de amilase, catalase, celulase, pectinase, protease, fosfatase e sideróforos, por fungos solubilizadores de fosfato, isolados de solo próximo a raízes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). .....47

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1-** Características químicas dos substratos utilizados na aclimatização de plantas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), em presença ou ausência de câmara úmida, em casa de vegetação. .... 60
- Tabela 2-** Características físicas dos substratos utilizados na aclimatização de plantas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), em presença ou ausência de câmara úmida, em casa de vegetação. .... 60
- Tabela 3-** Características nutricionais do substrato Bioplant<sup>®</sup> utilizado na aclimatização de plantas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), em presença ou ausência de câmara úmida, em casa de vegetação..... 60
- Tabela 4-** Porcentagem de sobrevivência e enraizamento de plantas micropropagadas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aclimatizadas em substratos, na presença ou ausência de câmara úmida..... 65
- Tabela 5-** Comprimento médio da parte aérea, número médio de folhas, gemas e comprimento médio da maior raiz de plantas micropropagadas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aclimatizadas em substratos, em presença ou ausência de câmara úmida, em casa de vegetação. .... 66

<b>Tabela 6-</b> Peso da massa fresca e seca de parte aérea e raízes de plantas micropropagadas de mangabeira ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes) aclimatizadas em substratos, em presença ou ausência de câmara úmida, em casa de vegetação. ....	67
<b>Tabela 7-</b> Porcentagem de sobrevivência, enraizamento e relação peso da massa seca das raízes/peso da massa seca da parte aérea (PMSR/PMSP) de mudas micropropagadas de mangabeira ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes), aclimatizadas em substratos, em casa de vegetação. ....	70
<b>Tabela 8-</b> Porcentagem de sobrevivência e enraizamento de mudas micropropagadas de mangabeira ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes), aclimatizadas em ausência ou presença câmara úmida e tratamentos de inoculação com fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e fungo micorrízico arbuscular (FMA) <i>Glomus clarum</i> , em casa de vegetação. ....	71
<b>Tabela 9-</b> Comprimento médio de parte aérea, número médio de folhas, gemas, comprimento médio da maior raiz, peso da massa fresca da parte aérea e raízes de mudas micropropagadas de mangabeira ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes), aclimatizadas em presença ou ausência de câmara úmida, em casa de vegetação. ....	74
<b>Tabela 10-</b> Comprimento médio de parte aérea, número médio de folhas, gemas, comprimento médio da maior raiz, peso da massa fresca da parte aérea e raízes de mudas micropropagadas de mangabeira ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes), aclimatizadas em substratos. ....	74

### CAPÍTULO 3

<b>Tabela 1-</b> Características químicas dos substratos utilizados na aclimatização de plantas de mangabeira ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes), em presença ou ausência de câmara úmida, em casa de vegetação. ....	88
<b>Tabela 2-</b> Características nutricionais do substrato Bioplant <sup>®</sup> utilizado na aclimatização de plantas de mangabeira ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes), em presença ou ausência de câmara úmida, em casa de vegetação. ....	88
<b>Tabela 3-</b> Características físicas dos substratos utilizados na aclimatização de plantas de mangabeira ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes), em presença ou ausência de câmara úmida, em casa de vegetação. ....	88
<b>Tabela 4-</b> Sais do meio de cultivo WPM ½ utilizados para preparo da solução nutritiva. ....	90

<b>Tabela 5-</b> Porcentagem de sobrevivência, comprimento médio da parte aérea, número médio de entrenós e relação peso da massa seca das raízes/peso da massa seca da parte aérea (PMSR/PMSP) de plantas micropropagadas de mangabeira ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes) aclimatizadas em substratos e câmara úmida, em casa de vegetação. ....	91
<b>Tabela 6-</b> Peso da massa seca das folhas, caule, raiz e total de plantas micropropagadas de mangabeira ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes) aclimatizadas em diferentes substratos e câmara úmida, em casa de vegetação.....	92
<b>Tabela 7-</b> Peso da massa fresca das folhas, caule, total, comprimento médio de entrenós, área foliar e razão da área foliar de plantas micropropagadas de mangabeira ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes) aclimatizadas em substratos, em casa de vegetação. ....	94
<b>Tabela 8-</b> Peso da massa fresca das folhas, caule, raiz, total, volume de raiz e área foliar de plantas micropropagadas de mangabeira ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes) aclimatizadas em diferentes câmaras úmidas, em casa de vegetação. ....	94
<b>Tabela 9-</b> Porcentagem de sobrevivência e eficiência simbiótica das mudas micropropagadas de mangabeira ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes) inoculadas com fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e fungo micorrízico arbuscular (FMA) <i>Glomus clarum</i> na aclimatização, em casa de vegetação. ....	98
<b>Tabela 10-</b> Comprimento médio da parte aérea, peso da massa seca das folhas, peso da massa fresca e seca total das plantas micropropagadas de mangabeira ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes) inoculadas com fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e fungo micorrízico arbuscular (FMA) <i>Glomus clarum</i> na aclimatização, em casa de vegetação.....	98
<b>Tabela 11-</b> Comprimento da maior raiz, número de entrenós, área foliar, peso da massa fresca das folhas e raízes de mudas micropropagadas de mangabeira ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes) inoculadas com fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e fungo micorrízico arbuscular (FMA) <i>Glomus clarum</i> na aclimatização, em casa de vegetação.....	100

#### CAPÍTULO 4

<b>Tabela 1-</b> Sais do meio de cultivo WPM ½ utilizados para preparo da solução nutritiva....	114
<b>Tabela 2-</b> Porcentagem de sobrevivência, enraizamento, comprimento médio da parte aérea e peso da massa fresca da parte aérea de plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas <i>in vitro</i> com fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e	

aclimatizadas em ausência ou presença de <i>Glomus clarum</i> , em casa de vegetação. .....	115
<b>Tabela 3-</b> Peso da massa fresca das folhas, caule, raízes, total das plantas e seca das folhas, raízes, parte aérea e total e das relações peso da massa seca da parte aérea/peso da massa seca total das plantas (PMSP/PMST) e peso da massa seca das raízes/peso da massa seca da parte aérea (PMSR/PMSP) de plantas micropropagadas de mangabeira aclimatizadas, em presença ou ausência de <i>Glomus clarum</i> , em casa de vegetação. .....	117
<b>Tabela 4-</b> Peso da massa seca das raízes, relação peso da massa fresca da parte aérea/peso da massa fresca total (PSPA/PST) e Eficiência simbiótica de plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas <i>in vitro</i> com fungos promotores do crescimento vegetal, em casa de vegetação. ....	119
<b>Tabela 5-</b> Porcentagem de sobrevivência e enraizamento de plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas <i>ex vitro</i> com fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) em ausência ou presença de <i>Glomus clarum</i> na aclimatização, em casa de vegetação.....	120
<b>Tabela 6-</b> Número médio de gemas e entrenós de plantas micropropagadas de mangabeira aclimatizadas em presença ou ausência de <i>Glomus clarum</i> , em casa de vegetação. .....	121
<b>Tabela 7-</b> Número médio de folhas e eficiência simbiótica de plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas <i>ex vitro</i> com fungos promotores do crescimento vegetal na aclimatização, em casa de vegetação. ....	122

## CAPÍTULO 5

<b>Tabela 1-</b> Sais do meio de cultivo WPM ½ utilizados para preparo da solução nutritiva....	136
<b>Tabela 2-</b> Comprimento médio da maior raiz, área e razão da área foliar, peso da massa fresca e seca das raízes de plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas com fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e <i>Glomus clarum</i> na aclimatização, em casa de vegetação. ....	138
<b>Tabela 3-</b> Peso da massa seca das folhas, caule, parte aérea e volume de raiz de plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas com fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e <i>Glomus clarum</i> na aclimatização, em casa de vegetação.....	138

<b>Tabela 4-</b> Relação peso da massa fresca da parte aérea/peso da massa fresca total (PMFP/PMFT), peso da massa seca da parte aérea/peso da massa seca total (PMSP/PMST), peso da massa fresca das raízes/peso da massa fresca da parte aérea (PMFR/PMFP) e peso da massa seca das raízes/peso da massa seca da parte aérea (PMSR/PMSP) de plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas com fungos promotores do crescimento vegetal e <i>Glomus clarum</i> na aclimatização, em casa de vegetação.....	139
<b>Tabela 5-</b> Porcentagem de sobrevivência, enraizamento e peso da massa fresca das raízes de plantas micropropagadas de mangabeira aclimatizadas com diferentes métodos de inoculação de fungos promotores do crescimento vegetal em ausência ou presença de <i>Glomus clarum</i> , em casa de vegetação.....	142
<b>Tabela 6-</b> Comprimento médio da parte aérea, maior raiz, diâmetro médio do caule, número médio de entrenós, peso da massa fresca e seca das raízes, relação peso da massa fresca das raízes/peso da massa fresca da parte aérea (PMFR/PMFP) e peso da massa seca das raízes/peso da massa seca da parte aérea (PMSR/PMSP) de plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas <i>ex vitro</i> em presença ou ausência de <i>Glomus clarum</i> na aclimatização, em casa de vegetação.....	143
<b>Tabela 7-</b> Relação peso da massa fresca da parte aérea/peso da massa fresca total (PMFP/PMFT) e peso da massa seca da parte aérea/peso da massa seca total (PMSP/PMST) de plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas <i>ex vitro</i> em presença ou ausência de <i>Glomus clarum</i> na aclimatização, em casa de vegetação. ....	144
<b>Tabela 8-</b> Área foliar, razão da área foliar e eficiência simbiótica de plantas micropropagadas de mangabeira aclimatizadas com diferentes métodos de inoculação de fungos promotores do crescimento vegetal, em casa de vegetação. ....	145

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1	REFERÊNCIAS .....	22
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	24
2.1	ACLIAMATIZAÇÃO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS .....	24
2.1.1	Sustratos na aclimatização de plantas micropropagadas .....	24
2.2	MICRORGANISMOS PROMOTORES DO CRESCIMENTO VEGETAL .....	26
2.2.1	Microrganismos promotores do crescimento vegetal na aclimatização de plantas micropropagadas .....	27
2.3	MANGABEIRA ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes) .....	28
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	31
	<b>CAPÍTULO 1: CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS DE FUNGOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO</b> .....	36
	<b>RESUMO:</b> .....	36
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	37
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	39
2.1	ENSAIOS BIOQUÍMICOS.....	39
2.1.1	Curva de produção de ácido indolacético (AIA) por fungos solubilizadores de fosfato .....	39
2.1.1.1	<i>Curva de calibração de ácido indolacético (AIA)</i> .....	40
2.1.1.2	<i>Síntese de ácido indolacético (AIA) por isolados fúngicos</i> .....	40
2.1.2	Avaliação qualitativa da produção de citocinina e giberelina por fungos solubilizadores de fosfato .....	41
2.1.2.1	<i>Cultivo dos isolados</i> .....	41
2.1.2.2	<i>Germinação das sementes de rabanete e determinação qualitativa da produção de citocinina e giberelina</i> .....	41
2.1.3	Síntese de sideróforos .....	42
2.2	ENSAIOS ENZIMÁTICOS .....	42
2.2.1	Produção de amilase.....	42
2.2.2	Produção de catalase .....	42
2.2.3	Produção de celulase .....	43
2.2.4	Produção de fosfatase.....	43

2.2.5	Produção de pectinase .....	43
2.2.6	Produção de protease .....	44
2	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	45
4	<b>CONCLUSÕES</b> .....	50
	REFERÊNCIAS .....	51

## **CAPÍTULO 2: ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE MANGABEIRA .....**

	<b>RESUMO:</b> .....	55
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	56
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	58
2.1	MATERIAL VEGETAL .....	58
2.2	ESTABELECIMENTO DE SEMENTES E MULTIPLICAÇÃO <i>in vitro</i> .....	58
	Ensaio I – Aclimatização de plantas de mangabeira em substratos e presença e ausência de câmara úmida .....	59
	Ensaio II – Inoculação de fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e do fungo micorrízico arbuscular (FMA) <i>Glomus clarum</i> em plantas de mangabeira .....	61
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	63
	Ensaio I – Aclimatização de plantas de mangabeira em substratos em presença e ausência de câmara úmida. ....	64
	Ensaio II – Inoculação de fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e do fungo micorrízico arbuscular (FMA) <i>Glomus clarum</i> em plantas de mangabeira .....	70
4	<b>CONCLUSÕES</b> .....	77
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	78

## **CAPÍTULO 3: SUBSTRATOS, CÂMARA ÚMIDA E FUNGOS PROMOTORES DO CRESCIMENTO VEGETAL NA ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE MANGABEIRA .....**

	<b>RESUMO:</b> .....	83
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	84
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	86
2.1	MATERIAL VEGETAL .....	86
2.2	PRÉ-ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS DE MANGABEIRA .....	86

	Ensaio I – Aclimatização de plantas de mangabeira em substratos e câmara úmida.....	87
	Ensaio II – Inoculação de plantas de mangabeira na aclimatização com fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e do <i>Glomus clarum</i> .....	89
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	91
	Ensaio I – Aclimatização de plantas de mangabeira em substratos e câmara úmida.....	91
	Ensaio II – Inoculação de plantas de mangabeira na aclimatização com fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e <i>Glomus clarum</i> .....	97
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	102
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	103

**CAPÍTULO 4: PLANTAS MICROPROPAGADAS DE MANGABEIRA INOCULADAS *in vitro* E *ex vitro* COM FUNGOS PROMOTORES DO CRESCIMENTO E ACLIMATIZADAS COM *Glomus clarum***..... 108

	<b>RESUMO:</b> .....	108
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	109
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	111
2.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL .....	111
	Ensaio I – Inoculação <i>in vitro</i> de fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) em frascos contendo plantas de mangabeira .....	111
	Ensaio II – Inoculação <i>ex vitro</i> de fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) em frascos contendo plantas de mangabeira .....	112
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	115
	Ensaio I – Inoculação <i>in vitro</i> de fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) em frascos contendo plantas de mangabeira .....	115
	Ensaio II – Inoculação <i>ex vitro</i> de fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) em frascos contendo plantas de mangabeira .....	120
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	124
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	126

**CAPÍTULO 5: ÉPOCA E MÉTODO DE INOCULAÇÃO DE FUNGOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM PLANTAS MICROPROPAGADAS DE MANGABEIRA NA ACLIMATIZAÇÃO** .....

	<b>RESUMO</b> .....	130
--	---------------------	-----

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	131
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	133
2.1	COLETA E DESPOLPA DE FRUTOS DE MANGABEIRA .....	133
2.2	ESTABELECIMENTO DE SEMENTES E MULTIPLICAÇÃO <i>in vitro</i> DE EXPLANTES DE MANGABEIRA .....	133
2.3	PRÉ-ACLIAMATIZAÇÃO .....	133
	Ensaio I – Época de inoculação de FPCV em mudas aclimatizadas de mangabeira, na presença ou ausência do FMA <i>Glomus clarum</i> .....	134
	Aclimatização e inoculação.....	134
	Ensaio II – Métodos de inoculação de FPCV em mudas aclimatizadas de mangabeira, na presença ou ausência do FMA <i>Glomus clarum</i> .....	135
	Aclimatização e inoculação.....	135
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	137
	Ensaio I – Época de inoculação de FPCV em mudas aclimatizadas de mangabeira, na presença ou ausência do FMA <i>Glomus clarum</i> .....	137
	Ensaio II – Métodos de inoculação de FPCV em mudas aclimatizadas de mangabeira, na presença ou ausência do FMA <i>Glomus clarum</i> .....	141
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	147
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	148
	<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	151

## 1 INTRODUÇÃO

A técnica de micropropagação possibilita a multiplicação em massa de mudas com características superiores, uniformes, livres de patógenos, em espaço físico reduzido e em curto período de tempo (OLIVEIRA et al., 2010). Em escala comercial, o sucesso dessa técnica depende da capacidade da planta produzida *in vitro* ser transferida para condições *ex vitro* a um baixo custo, com altas taxas de sobrevivência e crescimento (COSTA et al., 2009).

Tais mudas, entretanto, são altamente sensíveis às variações *ex vitro* (externas) e dependentes da fertilidade do substrato, exigindo extremo cuidado em seu manejo na fase de aclimatização. Devido às condições assépticas, essa técnica elimina os microrganismos benéficos associados ao tecido vegetal, incluindo os mutualistas, como bactérias e fungos micorrízicos arbusculares (FMA), que podem beneficiar o desempenho da planta sob condições de estresse, além de aumentar seu rendimento durante a fase de aclimatização (ANZANELLO; SOUZA; CASAMALI, 2011; CAMOLESI et al., 2010; COSTA; NEPOMUCENO; SANTANA, 2010; SOARES et al., 2009; MORAES et al., 2010).

Plantas micropropagadas, quando aclimatizadas, sofrem com a adaptação ao ambiente *ex vitro*, ocorrendo com isso perdas de mudas. Uma das técnicas utilizadas para diminuir essas perdas durante essa fase é a inoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal (SIQUEIRA et al., 1999). A utilização destes durante a aclimatização tem sido recomendada devido o aumento da tolerância a estresses bióticos e abióticos, promoção de crescimento, aumento da área foliar, número de folhas e da massa seca, redução do tempo de aclimatização, aumento da resistência a patógenos e sobrevivência das mudas após o transplante (OLIVEIRA et al., 2010).

A inoculação garante, ainda, a redução no tempo de aclimatização, formação mais precoce da muda, aumento da uniformidade do material obtido, melhor desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea, estabelecimento de uma comunidade rizosférica benéfica e a perspectiva de melhores resultados em campo. Além de reduzir o tempo de formação das mudas que envolvem altos custos de produção (ANZANELLO; SOUZA; CASAMALI, 2011; MARIANO et al., 2004; SANTOS et al., 2005).

As frutíferas do cerrado podem ser utilizadas na formação de pomares domésticos e comerciais, recuperação de áreas desmatadas ou degradadas, no plantio intercalado com florestas, em áreas de proteção ambiental ou em parques e jardins, no enriquecimento da flora, entre outros. Podem ser consumidas *in natura* ou usadas na produção de doces, geleias, sucos

e licores, além de suas folhas e cascas serem utilizadas na medicina popular, beneficiando os pequenos agricultores e comunidades rurais. Por causa do desmatamento, no entanto, áreas de preservação estão cada vez mais raras e o comércio de frutos deste bioma é feito, principalmente, a partir da coleta de plantas nativas.

Entre as árvores frutíferas nativas do cerrado, a mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) se destaca como uma das mais promissoras para os programas de exploração sustentável. A incorporação da mangabeira em sistemas de horticultura tem sido proposta como um meio para contribuir para a sua conservação e, também, reduzir a pobreza em áreas em que esta frutífera é nativa e cresce satisfatoriamente. Apesar de ter grande potencial para exploração econômica, a falta de informações sobre essa cultura vem restringindo seu cultivo comercial, tornando o seu aproveitamento limitado a pequenos produtores e a exploração extrativista (COSTA et al., 2005; SANTOS et al., 2010; SOARES et al., 2007; 2009).

Visto que são poucos os estudos com as plantas frutíferas do cerrado, torna-se necessário o conhecimento de técnicas que viabilizem a disponibilidade de mudas saudáveis, visto que algumas espécies podem ser usadas em diferentes programas, o que requer um elevado número de mudas. Desta forma, os objetivos específicos deste trabalho, com mangabeira, foram:

- Avaliar as características dos isolados fúngicos solubilizadores de fosfato obtidos de solo próximo rizosférico próximo de raízes de mangabeira, por meio de métodos qualitativos e quantitativos, para determinação de características bioquímicas e enzimáticas associadas à habilidade destes como promotores do crescimento vegetal.

- Seleção de substrato e câmara úmida para a fase de aclimatização de plantas micropropagadas de mangabeira em casa de vegetação.

- Avaliar a eficiência de fungos promotores do crescimento vegetal em mistura e sua interação com o fungo FMA *Glomus clarum*, na aclimatização de plantas micropropagadas de mangabeira em casa de vegetação.

- Avaliar a aclimatização de plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas *in vitro* com fungos promotores do crescimento vegetal isoladamente e *ex vitro* com *G. clarum* em casa de vegetação.

- Verificar o efeito da inoculação *ex vitro* de fungos promotores do crescimento vegetal isoladamente e sua interação com *G. clarum*, na aclimatização de plantas micropropagadas de mangabeira em casa de vegetação.

- Avaliar a melhor época para inoculação de fungos promotores do crescimento vegetal em mistura na aclimatização de plantas micropropagadas de mangabeira e sua interação com o fungo FMA *G. clarum* em casa de vegetação.

- Verificar melhor método de inoculação de fungos promotores do crescimento vegetal em mistura na aclimatização de plantas micropropagadas de mangabeira e sua interação com o fungo FMA *G. clarum* em casa de vegetação.

- Maximizar a produção de mudas a serem utilizadas em programas de formação de pomares e reflorestamento.

## REFERÊNCIAS

- ANZANELLO, R.; SOUZA, P. V. D.; CASAMALI, B. Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em porta-enxertos micropropagados de videira. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 2, p. 409-415, 2011.
- CAMOLESI, M. R.; FARIA, R. T. de; NEVES, C. S. V. J.; MARTINS, A. N. Volume do frasco e consistência do meio de cultura na multiplicação *in vitro* da bananeira 'Maçã'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 2, p. 255-260, 2010.
- COSTA, C. M. C.; CAVALCANTE, U. M. T.; GOTO, B. T.; SANTOS, V. F. dos; MAIA, L. C. Fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada em mudas de mangabeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 40, n. 3, p. 225-232, 2005.
- COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; SANTOS, A. M. Perda de água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeiras micropropagadas durante a aclimatização. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 742-748, 2009.
- COSTA, G. M. da; NEPOMUCENO, C. F.; SANTANA, J. R. F. de. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 5, p. 1090-1096, 2010.
- MARIANO, R. de L. R.; SILVEIRA, E. B. da; ASSIS, S. M. P. de; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.
- MORAES, A. M. de; ALMEIDA, F. de A. C.; BRUNO, R. de L. A.; CAZÉ FILHO, J.; NUNES, S. T.; GOMES, J. P. Micropropagação de abacaxizeiro cv. Emepa. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 9, p. 932-936, 2010.
- OLIVEIRA, J. R. G.; MORAES, T. A. L.; MELO, N. F.; YANO-MELO, A. M. Fungos micorrízicos arbusculares e rizobactérias promotoras de crescimento na aclimatização de *Zingiber spectabile*. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 3, p. 687-694, 2010.
- SANTOS, M. H. L. C.; MARIANO, R. de L. R.; CAMARA, T. R.; ANDRADE, A. G. de; WILLADINO, L.; LIMA, G. P. P. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. **Hoehnea**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 2-8, 2005.
- SANTOS, P. C. G. dos; ALVES, E. U.; GUEDES, R. S.; SILVA, K. B.; CARDOSO, E. de A.; LIMA, C. R. de. Qualidade de sementes de *Hancornia speciosa* Gomes em função do tempo de secagem. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 343-352, 2010.
- SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M.S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras-MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/Universidade Federal de Lavras/Departamento de Ciência do Solo, 1999. 818 p.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A. de; NOGUEIRA, R. C.; EMRICH, E. C.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes de caulinares de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, 2007.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; STEIN, V. C.; NERY, F. C.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA<sub>3</sub> e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1847-1852, 2009.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS

A aclimatização é a fase final da micropropagação, sendo crítica devido o estresse que as plantas sofrem durante a transferência das condições *in vitro* (heterotróficas) para *ex vitro* (autotróficas), o que pode ocasionar baixas taxas de sobrevivência de planta. Com isso as altas taxas de mortalidade tornam-se um fator limitante no processo de micropropagação (ROCHA et al., 2008; SCHUCK et al., 2012; SORACE et al., 2007).

A desidratação *ex vitro* das plantas ocorre devido à mudança das condições ambientais, pois plantas cultivadas *in vitro* têm como característica baixa regulação da perda de água, devido à pouca funcionalidade dos estômatos, baixa formação de cera epicuticular e reduzido desenvolvimento do mesófilo foliar, principalmente os parênquimas clorofilianos e feixes vasculares (COSTA et al., 2009). Além de suas folhas serem pequenas e finas e o sistema radicular pouco desenvolvido, possuem baixa quantidade de tricomas e atividade fotoautotrófica (IAREMA et al., 2012).

A baixa sobrevivência de plantas durante a aclimatização pode ocorrer devido à alta perda de água (desidratação) que sofrem durante o período desta fase (SCHUCK et al., 2012). As plantas cultivadas *in vitro* precisam ativar os aparatos fotossintéticos durante a aclimatização, pois estas têm baixa atividade fotossintética, por receberem fontes de carboidratos prontamente disponível no meio de cultivo, além de serem mantidas em salas de crescimento com baixa irradiância, trocas gasosas e temperatura controlada, gerando plantas com elevado conteúdo de água (BANDEIRA et al., 2007; DAMIANI; SCHUCH, 2009).

Essa transferência para a condição *ex vitro* depende de fatores que garantam a manutenção mecânica do sistema radicular, a estabilidade da planta, o suprimento de água e nutrientes e as trocas gasosas entre as raízes e o ar atmosférico (WAGNER JÚNIOR et al., 2012).

#### 2.1.1 Substratos na aclimatização de plantas micropropagadas

O substrato utilizado durante a fase de aclimatização de plantas micropropagadas influencia a sobrevivência, o crescimento e o desenvolvimento dessas plantas. Com isso, o material utilizado deve prover, principalmente, elevado espaço de aeração associado à elevada capacidade de retenção de água (SCHUCK et al., 2012). Ademais, este deve ter boas

características físicas, químicas e biológicas, proporcionando rápido desenvolvimento da muda e formação de sistema radicular abundante, como resultado de uma boa relação água/ar. Ainda, devem fornecer os nutrientes necessários para o crescimento das plantas, com composição uniforme para facilitar o manejo das mudas e custo compatível com a atividade (DIAS; PEREIRA; SOUSA, 2007; OLIVEIRA et al., 2014; PAIVA SOBRINHO et al., 2010).

As propriedades físicas e químicas devem promover boa retenção de água, volume adequado de espaços porosos preenchidos por gases e adequada taxa de difusão de oxigênio necessária à respiração das raízes, textura e estrutura adequada e disponibilidade de nutrientes, atendendo as necessidades da planta, além da ausência de patógenos (PIO et al., 2004; WAGNER JÚNIOR et al., 2012). Fundamental para o desenvolvimento das raízes é que a baixa densidade, a boa capacidade de absorção e retenção de água, a aeração e a drenagem evitem o acúmulo de umidade e substâncias tóxicas (PAIVA SOBRINHO et al., 2010).

Algumas destas importantes características definem a qualidade de um material a ser escolhido como substrato (WAGNER JÚNIOR et al., 2012). Essas características variam de acordo com o material utilizado na composição do substrato e podem afetar o estabelecimento da planta nesta fase, demonstrando a importância da escolha do substrato com composição ideal (SILVA et al., 2011).

Substratos formados por um único material dificilmente irão suprir as necessidades desejadas para aclimatização de plantas micropropagadas, sendo a principal a capacidade de retenção de água. Por isto, é adequada a utilização de mistura de substratos (SCHUCK et al., 2012). A composição de um substrato pode ter solo mineral, orgânico ou diversos materiais, constituindo-se, assim, uma mistura, e deve ter equilíbrio adequado entre umidade e aeração, ser poroso o suficiente para permitir trocas gasosas eficientes, livre de patógenos ou microrganismos saprófitos, isento de propágulos (sementes ou estruturas vegetativas) de invasoras e de baixa densidade (SILVA et al., 2011).

A proporção dos materiais que compõem a mistura define a qualidade do substrato. No entanto, misturas são sistemas cujas propriedades dependem das proporções relativas dos seus componentes e não de suas concentrações (DIAS; PEREIRA; SOUSA, 2007). Como exemplo, a fonte orgânica é responsável pela retenção e umidade, além de fornecimento de parte dos nutrientes para o crescimento das mudas (PAIVA SOBRINHO et al., 2010).

## 2.2 MICRORGANISMOS PROMOTORES DO CRESCIMENTO VEGETAL

Os microrganismos promotores do crescimento vegetal beneficiam as plantas por meio de mecanismos diretos, como fixação de nitrogênio, produção de fitormônios, redução dos níveis de etileno no solo, solubilização de fosfato e secreção de sideróforos. As formas indiretas incluem mecanismos de biocontrole, produção de antibióticos, indução de resistência sistêmica entre outros, mostrando, desta forma, diversas características que podem ser utilizados como inoculantes microbianos na agricultura (AGUADO-SANTACRUZ et al., 2012; MOREIRA; ARAÚJO, 2013; OLIVEIRA et al., 2012; RAHI et al., 2009; SILVA et al., 2006).

Alguns desses microrganismos são capazes de estimular o crescimento das plantas por meio da redução dos níveis de etileno nas mesmas, por meio da ação da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase, diminuindo a produção de etileno nas raízes nas plantas hospedeiras, resultando em seu alongamento. A promoção do crescimento radicular é um dos efeitos benéficos dos microrganismos promotores do crescimento vegetal, pois o estabelecimento rápido das raízes laterais e adventícias é uma característica vantajosa para as plantas, aumentando a habilidade de se fixar ao solo e obter água e nutrientes do ambiente (MOREIRA; ARAÚJO, 2013).

A supressão de doenças por microrganismos benéficos da rizosfera pode ocorrer por vários mecanismos de ação, como: antagonismo relacionado à produção de antibióticos antifúngicos, competição por espaço e nutrientes com fitopatógenos e outros microrganismos prejudiciais à rizosfera e indução de resistência nas plantas (MOREIRA; ARAÚJO, 2013).

Outros microrganismos são solubilizadores de fosfato (MSF) por secretarem ácidos orgânicos, e/ou fosfatases que facilitam a conversão de formas insolúveis de fósforo (P) para formas disponíveis para as plantas (MOREIRA; ARAÚJO, 2013). No ciclo do P no solo, os microrganismos são fatores importantes, onde o P orgânico pode ser liberado por meio da mineralização e o P inorgânico por meio da hidrólise de monoésteres por fosfomonoesterase alcalina e ácida. As plantas liberam apenas a fosfomonoesterase ácida, enquanto os microrganismos podem produzir a ácida e alcalina. Com isso, os microrganismos demonstram maior envolvimento no ciclo do P contribuindo para maior nutrição das plantas (CUI et al., 2015).

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são microrganismos simbióticos e podem promover a absorção de P pelas plantas hospedeiras, principalmente em solos limitantes para este nutriente, uma vez que, por meio das hifas, aumentam o volume de solo explorado e a tolerância a estresses bióticos e abióticos (COELHO et al., 2012). Além de melhorarem a qualidade do solo por meio da agregação do solo com glomalina, promovem aumentos na

tolerância a seca e de resistência a doenças da planta hospedeira e interage com outros microrganismos, proporcionando maior crescimento das plantas (CUI et al., 2015; VÁSQUEZ et al., 2000). Tanto os FMA quanto para os microrganismos de vida livre produtores de fitormônios ou agentes de controle biológico demonstram efeitos positivos diretos e indiretos na promoção do crescimento das plantas (VÁSQUEZ et al., 2000).

Os microrganismos produtores de enzimas extracelulares que desempenham papel importante no processo de decomposição da matéria orgânica dos solos podem ser, também, importantes agentes de controle de patógenos de plantas, solubilização de fosfato, competição com competição de plantas por substrato e nutrientes ou na promoção do crescimento de plantas (SOUSA; SOARES; GARRIDO, 2008). Organismos produtores de enzimas são de interesse para serem usados em processos como uso potencial em biorremediação, biodegradação, degradação e desintoxicação de substâncias recalcitrantes (TORTELLA et al., 2008).

### **2.2.1 Microrganismos promotores do crescimento vegetal na aclimatização de plantas micropropagadas**

A inoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal, isolados ou em mistura, pode elevar a porcentagem de sobrevivência e crescimento das plantas, como sua produtividade (OLIVEIRA et al., 2010). Com isso, entre os métodos que favorecem o crescimento de mudas micropropagadas aclimatizadas, está a utilização de microrganismos benéficos, como FMA, solubilizadores de fosfato e bactérias fixadoras de nitrogênio (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A reintrodução, durante a aclimatização, destes organismos perdidos durante o cultivo *in vitro*, favorece a proteção das plantas micropropagadas contra doenças e melhora o seu crescimento por meio da disponibilidade de nutrientes e síntese de fitormônios (THOMAS et al., 2010).

Os FMA são amplamente reconhecidos pelos diversos efeitos positivos proporcionados ao crescimento vegetal, e a sua inoculação durante a aclimatização de plantas micropropagadas promove rápido crescimento da muda, redução no tempo de aclimatização, aumento da área de absorção de nutrientes, superfície de contato com o solo e tolerância a estresses abióticos e bióticos no momento de transferência das plantas cultivadas *in vitro* para condições *ex vitro* (ANZANELLO; SOUZA; CASAMALI, 2011; FARIAS et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2010; SILVA et al., 2006).

Para obtenção de sucesso com a inoculação do FMA é importante que a simbiose com a planta micropropagada seja estabelecida em curto período de tempo. Seu uso tem mostrado

beneficiar o desenvolvimento de mudas de espécies arbóreas em viveiro, maximizando sua capacidade de estabelecimento em campo (ANZANELLO; SOUZA; CASAMALI, 2011).

A co-inoculação de FMA com outros microrganismos promotores do crescimento vegetal na fase de aclimatização aumenta o rendimento das plantas micropropagadas, devido à supressão de doenças, produção de fitormônios e eficiência na absorção de nutrientes (OLIVEIRA et al., 2010).

Outros microrganismos edáficos têm a habilidade de estimular o crescimento vegetal, por meio da produção de fitormônios (giberelinas, auxinas, citocininas e substâncias análogas) e solubilização de fosfatos. Os MSF desempenham importante papel no suprimento de P às plantas e sua ação solubilizadora tem sido associada, principalmente, à produção de ácidos orgânicos (ALVES; SILVA FILHO, 2009; BARROSO; NAHAS, 2008). No solo, os MSF contribuem para aumentar a concentração de P na solução, que pode ser absorvido diretamente pelas raízes ou pelas hifas de FMA em simbiose (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A inoculação de MSF, aliados ou não a outros microrganismos benéficos do solo, pode incrementar o desenvolvimento vegetal (NARLOCH et al., 2002; SILVA FILHO; VIDOR, 2001), o qual pode ser induzido de forma direta, pela produção de hormônios de crescimento, ou indireta, pela modificação da microbiota da rizosfera. Este último é considerado um dos principais mecanismos de ação, devido à supressão de microrganismos deletérios (MELO; AZEVEDO, 1998).

### 2.3 MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes)

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma espécie arbórea frutífera, nativa do Brasil, típica de solos arenosos, ácidos e pobres em nutrientes, encontrada nas regiões Centro-Oeste, Sudeste, Norte, Nordeste e nas áreas de tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas da região Nordeste. Com grande importância social, econômica e cultural nas áreas em que ocorre (BARROS et al., 2011a; COSTA et al., 2011; SANTOS et al., 2010).

Esta pertence à Família Apocynaceae, têm porte médio, lactescente, com 2 a 10 m de altura, podendo chegar até 15 m. Produz de 100 - 400 frutos por planta, do tipo baga, de tamanho, formato e cores variados, amarelados ou esverdeados, com pigmentação vermelha ou sem pigmentação. A polpa é amarela adocicada, rica em vitaminas, ferro (Fe), P, cálcio (Ca) e proteínas (ANJOS et al., 2009; BARROS et al., 2006; COSTA et al., 2011). Em áreas de Cerrado, seus frutos são normalmente arredondados com peso variando de 30 a 260 g, o número de sementes varia de 8 a 35 por fruto, sendo estas compridas, achatadas e discoides, com hilo

central, testa de coloração marrom-amarelada, fina e endosperma branco triangulas (VIEIRA et al., 2006; SANTOS et al., 2010).

Seus frutos são apreciados pelas suas excelentes características físicas, aroma e sabor, associado ao seu elevado valor nutricional, porém têm poucos pomares organizados ou implantados para a produção de frutos e exploração tecnificada e racional desta espécie. Desta forma, sua exploração ainda é, predominantemente, por extrativismo (COSTA et al., 2011; SILVA; NASCIMENTO; NAVES, 2006; SOARES et al., 2007b; 2009).

Seus frutos podem ser consumidos *in natura* ou sua polpa utilizada no preparo de sucos, picolé, sorvete, doce, vinho, vinagre e licor, sendo considerada uma boa fonte de Fe, manganês (Mn), zinco (Zn), vitamina C e proteínas (1,3 a 3,0 %). Estes já são comercializados em supermercados, sendo encontrado em bandejas de isopor revestidas com filme de PVC (BARROS et al., 2011a; 2010b; SANTOS et al., 2011; SOUZA et al., 2007). Na medicina tradicional, o látex obtido do tronco da mangabeira é usado para proteger contra doenças gástricas e tuberculose, estimular a função hepática e tratar acne, verrugas, hipertensão e certos tipos de inflamações (BARROS et al., 2010b; ENDRINGER; PEZZUTO; BRAGA, 2009; MARINHO et al., 2011; SAMPAIO; NOGUEIRA, 2006).

O látex da mangabeira tem potencial para outros usos industriais, uma vez que suas propriedades físico-mecânicas conferem boas características tecnológicas, podendo ser usado em aplicações comerciais, como impermeabilização de tecidos, confecção de bolsas e produção de borracha. Sua madeira é utilizada na carpintaria, para confecção de caixas e para produção de carvão (BARROS et al., 2010b; SILVA et al., 2011). A mangabeira pode, ainda, ser usada para o reflorestamento ou recomposição de áreas degradadas ou com baixa capacidade de uso e manutenção da biodiversidade (ANJOS et al., 2009; VIEIRA et al., 2006).

Sua propagação pode ser via assexuada, utilizando partes do vegetal e sexuada, por meio da semente (BARROS et al., 2011a). As sementes têm curta longevidade e seu mesocarpo tem uma ação inibitória sobre a germinação, sendo necessária a semeadura imediatamente ou até 48h após a retirada dos frutos, visto que o poder germinativo das sementes cai rapidamente a partir do quarto dia. A recalcitrância e a redução do teor de água podem ocasionar danos, prejudicando sua viabilidade e vigor das sementes e, com isso, reduzir seu poder germinativo (BASTOS et al., 2007; BARROS et al., 2010b; SANTOS et al., 2010; SOARES et al., 2007a; SOARES et al., 2009). Suas mudas têm crescimento lento, o que é comum em árvores do cerrado. Esta característica reduz o interesse em propagar a mangaba e outras árvores frutíferas (CALDAS et al., 2009; COSTA et al., 2005; PINHEIRO et al., 2001)

A técnica de micropropagação possibilita a multiplicação em massa de mudas com características geneticamente superiores, uniformes, livres de patógenos, em espaço físico reduzido e em curto período de tempo (SOARES et al., 2007b; 2011). Entretanto, tais mudas são altamente sensíveis às variações externas e dependentes da fertilidade do substrato, exigindo extremo cuidado em seu manejo, principalmente na fase de aclimatização.

## REFERÊNCIAS

- AGUADO-SANTACRUZ, G. A.; MORENO-GÓMEZ, B.; JIMÉNEZ-FRANCISCO, B.; GARCÍA-MOYA, E.; PRECIANDO-ORTIZ, R. E. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. **Revista Fitotecnia Mexicana**, Chapingo, v. 35, n. 1, p. 9-21, 2012.
- ALVES, L.; SILVA FILHO, G. N. Produção de mudas de alface (*Lactuca sativa* L.) em presença de diferentes fontes fosfatadas e microorganismos solubilizadores de fosfatos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 557-562, 2009.
- ANJOS, J. R. N. dos; CHARCAR, M. J. D' A.; LEITE, R. G.; SILVA, M. S. Levantamento e patogenicidade de fungos associados às sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) no cerrado do Brasil central. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 3, p. 911-915, 2009.
- ANZANELLO, R.; SOUZA, P. V. D.; CASAMALI, B. Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em porta-enxertos micropropagados de videira. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 2, p. 409-415, 2011.
- BANDEIRA, F. S.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; LANI, E. R. G. Aclimatização *ex vitro* de plantas propagadas pela enxertia *in vitro* de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 5, p. 773-781, 2007.
- BARROS, D. I.; BRUNO, R. L. A.; NUNES, H. V.; BHERING, M. C. Teste de tetrazólio em sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). **Acta Tecnológica**, São Luís, v. 5, n. 2, p. 17-31, 2011a.
- BARROS, D. I.; BRUNO, R. de L. A.; NUNES, H. V.; SILVA, G. C. da; PEREIRA, W. E.; MENDONÇA, R. M. N. Métodos de extração de sementes de mangaba visando à qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 25-27, 2006.
- BARROS, D. I.; BRUNO, R de L. A.; NUNES, H. V.; MENDONÇA, R. M. N.; PEREIRA, W. E. Comportamento fisiológico de sementes de mangaba submetidas à dessecação. **Acta Tecnológica**, São Luís, v. 5, n.1, p. 31-43, 2010b.
- BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 4, p. 529-535, 2008.
- BASTOS, L. P.; MOREIRA, M. J. S.; COSTA, M. A. P. de C.; ROCHA, M. C. da; HANSEN, D. de S.; SILVA, S. A.; DANTAS, A. C. V. L.; SOUSA, C. da S. Cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1122-1124, 2007.
- CALDAS, L. S.; MACHADO, L. de L.; CALDAS, S. C.; CAMPOS, M. L.; CALDAS, J. A.; PHARIS, R. P.; PEREIRA-NETTO, A. B. Growth-active gibberellins overcome the very slow shoot growth of *Hancornia speciosa*, an important fruit tree from the Brazilian "Cerrado". **Trees**, Vancouver, v. 23, n. 6, p. 1229-1235, 2009.

COELHO, I. R.; CAVALCANTE, U. M. T.; CAMPOS, M. A. S.; SILVA, F. S. B. Uso de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) na promoção do crescimento de mudas de pinheira (*Annona squamosa* L., Annonaceae). **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 26, n. 4, p. 933-937, 2012.

COSTA, C. M. C.; CAVALCANTE, U. M. T.; GOTO, B. T.; SANTOS, V. F. dos; MAIA, L. C. Fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada em mudas de mangabeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 40, n. 3, p. 225-232, 2005.

COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; SANTOS, A. M. Perda de água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeiras micropropagadas durante a aclimatização. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 742-748, 2009.

COSTA, T. S.; SILVA, A. V. C.; LÉDO, A. S.; SANTOS, A. R. F.; SILVA JÚNIOR, J. F. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 46, n. 5, p. 499-508, 2011.

CUI, H.; ZHOU, Y.; GU, Z.; ZHU, H.; FU, S.; YAO, Q. The combined effects of cover crops and symbiotic microbes on phosphatase gene and organic phosphorus hydrolysis in subtropical orchard soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 82, p. 119-126, 2015.

DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Diferentes substratos e ambientes no enraizamento *in vitro* de mirtilo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 2, p. 563-566, 2009.

DIAS, T. J.; PEREIRA, W. E.; SOUSA, G. G. Fertilidade de substratos para mudas de mangabeira, contendo fibra de coco e adubados com fósforo. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringa, v. 29, n. 5, p. 649-658, 2007.

ENDRINGER, D. C.; PEZZUTO, J. M.; BRAGA, F. C. NF-κB inhibitory activity of cyclitols isolated from *Hancornia speciosa*. **Phytomedicine**, Jena, v. 16, n. 11, p. 1064-1069, 2009.

FARIAS, D. H.; PINTO, M. A. B.; CARRA, B.; SCHUCH, M. W.; SOUZA, P. V. D. Desenvolvimento de mudas de mirtilheiro inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 3, p. 655-663, 2014.

IAREMA, L.; CRUZ, A. C. F. C.; SALDANHA, C. W.; DIAS, L. L. C.; VIEIRA, R. F.; OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 110, n. 2, p. 227-238, 2012.

MARINHO, D. G.; ALVIANO, D. S.; MATHEUS, M. E.; ALVIANO, C. S.; FERNANDES, P. D. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 135, n. 2, p. 530-537, 2011.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. 488 p.

- MOREIRA, A. L. L.; ARAÚJO, F. F. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* spp. como potenciais promotores de crescimento de *Eucalyptus urograndis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 37, n. 5, p. 933-943, 2013.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.
- NARLOCH, C.; OLIVEIRA, V. L. de; ANJOS, J. T. dos; SILVA FILHO, G. Respostas da cultura do rabanete à inoculação de fungos solubilizadores de fosfatos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 6, p. 841-845, 2002.
- OLIVEIRA, A. G.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; SANTOS, G. R.; MILLER, L. O.; CHAGAS, L. F. B. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 7, n. 3, p. 149-155, 2012.
- OLIVEIRA, J. A. A.; PEREIRA, M. C. T.; NIETSCH, S.; SOUZA, V. N. R.; COSTA, I. J. S. Aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira em diferentes substratos e recipientes. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 9, n. 1, p. 72-78, 2014.
- OLIVEIRA, J. R. G.; MORAES, T. A. L.; MELO, N. F.; YANO-MELO, A. M. Fungos micorrízicos arbusculares e rizobactérias promotoras de crescimento na aclimatização de *Zingiber spectabile*. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 3, p. 687-694, 2010.
- PAIVA SOBRINHO, S.; LUZ, P. B.; SILVEIRA, T. L. S.; RAMOS, D. T.; NEVES, L. G.; BARELLI, M. A. A. Substratos na produção de mudas de três espécies arbóreas do cerrado. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 5, n. 2, p. 238-243, 2010.
- PIO, R.; GONTIJO, T. C. A.; CARRIJO, E. P.; RAMOS, J. D.; TOLEDO, M.; VISIOLI, E. L.; TOMASETTO, F. Efeito de diferentes substratos no crescimento de mudas de nespereira. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 3, p. 309-312, 2004.
- PINHEIRO, C. S. R.; MEDEIROS, D. N. de; MACÊDO, C. E. C. de; ALLOUFA, M. A. I. Germinação *in vitro* de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 413-416, 2001.
- RAHI, P.; VYAS, P.; SHARMA, S.; GULATI, A.; GULATI, A. Plant growth promoting potential of the fungus *Discosia* sp. FIHB 571 from tea rhizosphere tested on chickpea, maize and pea. **Indian Journal Microbiology**, Pune, v. 49, n. 2, p. 128-133, 2009.
- ROCHA, M. A. C.; COSTA, M. A. P. C.; SILVA, S. A.; LEDO, C. A. S.; MOREIRA, M. J. S.; BASTOS, L. P. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 769-774, 2008.
- SAMPAIO, T. S.; NOGUEIRA, P. C. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, Oxford, v. 95, n. 4, p. 606-610, 2006.

- SANTOS, M. C.; LÉDO, A. S.; LÉDO, C. A. S.; SOUZA, F. V. D.; SILVA JUNIOR, J. F.S. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 42, n. 3, p. 735-741, 2011.
- SANTOS, P. C. G. dos; ALVES, E. U.; GUEDES, R. S.; SILVA, K. B.; CARDOSO, E. de A.; LIMA, C. R. de. Qualidade de sementes de *Hancornia speciosa* Gomes em função do tempo de secagem. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 343-352, 2010.
- SCHUCK, M. R.; LIPSKI, B.; SILVA, A. L. L.; CARVALHO, D. C.; BIASI, L. A. Aclimatização de plantas micropropagadas de videira cv. Bordô (*Vitis labrusca* L.) em diferentes substratos. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 3, n. 4, p. 2016-212, 2012.
- SILVA, E. A.; OLIVEIRA, A. C.; MENDONÇA, V.; SOARES, F. M. Substratos na produção de mudas de mangabeira em tubetes. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 2, p. 279-285, 2011.
- SILVA, M. A.; SILVA, F. S. B.; YANO-MELO, A. M.; MELO, N. F.; MAIA, L. C. Fungos micorrízicos arbusculares e vermicomposto na aclimação de *Alpinia purpurata* (Viell.) Schum e *Zingiber spectabile* Griff. (Zingiberaceae). **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 20, n. 2, p. 249-256, 2006.
- SILVA, S. M. C.; NASCIMENTO, J. L.; NAVES, R. V. Produção da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) irrigada e adubada nas condições do estado de Goiás. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 22, n. 2, p. 43-51, 2006.
- SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n. 12, p.1495-1508, 2001.
- SILVA, R. L.O.; LUZ, J. S.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botanica Brasilia**, Belo Horizonte, v. 20, n. 3, p. 649-655, 2006.
- SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A.; NERY, F. C.; VARGAS, D. P.; SILVA, D. R. G. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 152-157, 2011.
- SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A.; NOGUEIRA, R. C.; EMRICH, E. B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, 2007b.
- SOARES, F. P.; PAIVA, R.; CAMPOS, A. C. A. L.; PORTO, J. M. P.; NOGUEIRA, R. C.; STEIN, V. C. Germinação de sementes de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1180-1182, 2007a.

- SOARES, F. P.; PAIVA, R.; STEIN, V. C.; NERY, F. C.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA<sub>3</sub> e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1847-1852, 2009.
- SOUSA, C. S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S. Characterization of streptomycetes with potential to promote plant growth and biocontrol. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 1, p. 50-55, 2008.
- SORACE, M.; FARIA, R. T.; YAMAMOTO, L. Y.; SCHNITZER, J. A.; TAKAHASHI, L. S. A. Influência de auxina na aclimatização de *Oncidium baueri* (Orchidaceae). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 195-200, 2007.
- SOUZA, F. G.; FIGUEIREDO, R. W.; ALVES, R. E.; MAIA, G. A.; ARAÚJO, I. A. Qualidade pós-colheita de frutos de diferentes clones de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1449-1454, 2007.
- TORTELLA, G. R.; RUBILAR, O.; GIANFREDA, L.; VALENZUELA, E.; DIEZ, M. C. Enzymatic characterization of Chilean native wood-rotting fungi for potential use in the bioremediation of polluted environments with chlorophenols. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 24, n. 12, p. 2805-2818, 2008.
- THOMAS, J.; AJAY, D.; KUMAR, R. R.; MANDAL, A. K. A. Influence of beneficial microorganisms during *in vivo* acclimatization of *in vitro*-derived tea (*Camellia sinensis*) plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 101, n. 3, p. 365-370, 2010.
- VÁSQUEZ, M. M.; CÉSAR, S.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 261-272, 2000.
- VIEIRA, R. F.; COSTA, T. S. A.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. **Frutas nativas da Região Centro-Oeste**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2006. 320 p.
- WAGNER JÚNIOR, A.; FRANZON, R. C.; COUTO, M.; CONCEIÇÃO, P. C.; FORTES, G. R. L. Níveis de vermiculita em mistura de substrato na aclimatização de plantas de amoreira-preta "Tupy". **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 18, n. 2-4, p. 188-195, 2012.

## CAPÍTULO 1

### CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS DE FUNGOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO

**RESUMO:** Objetivou-se com este trabalho avaliar a capacidade de isolados de fungos solubilizadores de fosfato (MSP), obtidos de solo rizosférico próximo de raízes de mangabeira, de produzirem fitormônios, enzimas extracelulares e sideróforos. Quatro isolados fúngicos (MA2, MA5, MF1 e MF3) tiveram seu potencial avaliado quanto à síntese de ácido indol acético (AIA) e produção de sideróforos utilizando métodos colorimétricos e por forma qualitativa quanto à produção de citocinina e giberelina utilizando hipocótilos e cotilédones de rabanete. Para a indução da produção das enzimas extracelulares, discos com 5 mm de diâmetro contendo micélio, foram transferidos para placas de Petri contendo o meio de cultura específico, e incubados 28 °C por 72 h. A avaliação da produção enzimática se deu pela presença ou ausência de halo de degradação ao redor da colônia. A máxima síntese de AIA foi observada após 4 dias de incubação, sendo a maior produção obtida com o isolado MA5. Para giberelina e citocinina, o isolado MF1 proporcionou maior peso da massa fresca e seca, enquanto o MA2 teve apenas maior peso da massa seca de hipocótilos. O maior peso da massa seca de cotilédones foi exibido pelo isolado MA5. Entre as enzimas extracelulares, todos os isolados fúngicos mostraram ser produtores de amilase, enquanto apenas o MF1 foi positivo para catalase e MF3 para pectinase e protease. Nenhum isolado exibiu produção de celulase ou de sideróforos, mas todos foram positivos para fosfatase. Portanto, a produção de AIA foi mais elevada no isolado MA5. Os maiores crescimentos de cotilédones e hipocótilos de rabanete foram proporcionados pelos isolados MF1 e MA5. MF1 e MF3 demonstraram maior capacidade de produção de diferentes enzimas.

**Palavras-chave:** Promoção do crescimento vegetal. Fitormônios. Auxina. Enzimas. Biotecnologia.

## 1 INTRODUÇÃO

Microrganismos promotores do crescimento vegetal podem beneficiar as plantas diretamente, por meio de mecanismos como a fixação de nitrogênio, produção de fitormônios, redução dos níveis de etileno no solo e solubilização de fosfato, ou indiretamente por meio de mecanismos que incluem mecanismos de biocontrole, produção de antibióticos, indução de resistência sistêmica, entre outros. Os mais procurados para serem inoculantes microbianos na agricultura são aqueles que possuem diversas características (AGUADO-SANTACRUZ et al., 2012; MOREIRA; ARAÚJO, 2013; OLIVEIRA et al., 2012; RAHI et al., 2009).

Os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) representam uma porcentagem considerável do total de microrganismos na rizosfera de várias espécies vegetais, desempenhando importante papel no suprimento de fósforo (P) às plantas. Entre os mecanismos envolvidos na solubilização de fosfatos se destacam a produção de ácidos orgânicos de baixo peso molecular e a produção de fosfatase ácida e alcalina (CHAGAS JUNIOR et al., 2010; KUSS et al., 2007; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Outros microrganismos produzem ou aumentam a concentração de fitormônios, como auxinas, citocininas, giberelinas e etileno nas plantas, além de controlarem agentes fitopatogênicos provenientes do solo ou das sementes, por meio da produção de sideróforos, de enzimas (1,3-glucanase e quitinases), do ácido cianídrico ou de compostos antimicrobianos. Com isso são responsáveis pela maximização do crescimento observado em algumas plantas, aumentando a produção agrícola (CAMPOS; ONO; RODRIGUES, 2009; RADWAN; MOHAMED; REIS, 2004; 2005; RAMAMOORTHY et al., 2001).

A auxina que liberam pode afetar a morfologia das raízes, aumentando o comprimento e o número de pêlos radiculares, enquanto a giberelina promove o alongamento do caule de diversas espécies, aumentando tanto o alongamento quanto a divisão celular. As citocininas induz o crescimento de gemas laterais, desenvolvimento de cloroplastos e expansão de folhas (CAMPOS et al., 2009; RADWAN; MOHAMED; REIS, 2004; 2005).

Os microrganismos do solo são responsáveis pela degradação de diferentes elementos da matéria orgânica do solo, transformados em uma variedade de biomoléculas e metabólitos secundários, liberados via ação de várias enzimas (DUBEY; TRIPATHI; UPADHYAY, 2006; TORTELLA et al., 2008; XU, 2006). Algumas destas enzimas de interesse biotecnológico são amilase, protease, pectinase e celulase (AVELLANEDA-TORRES; PULIDO; ROJAS, 2014; GRIEBELER et al., 2015).

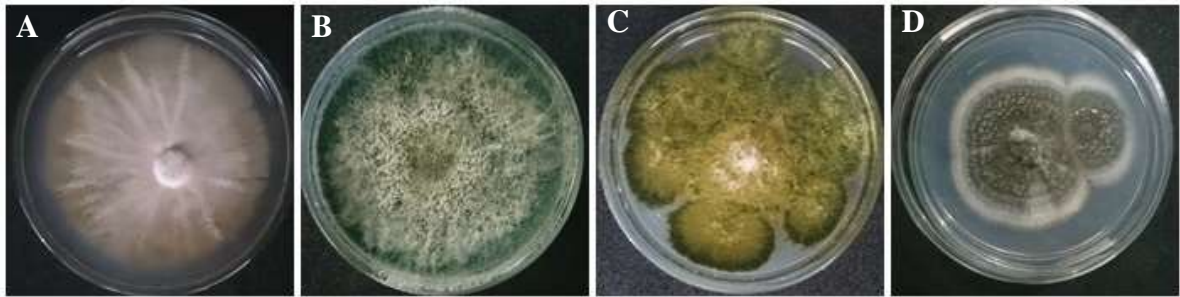
Objetivou-se com este trabalho avaliar a capacidade de isolados fúngicos

solubilizadores de fosfato, obtidos de solo rizosférico próximo de raízes de mangabeira, de produzirem fitormônios, enzimas extracelulares e sideróforos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados quatro isolados fúngicos (MA2, MA5, MF1 e MF3) solubilizadores de fosfato, pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia Agrícola do Instituto Federal Goiano, *Campus* Rio Verde, GO (Figura 1). Estes foram isolados de solo rizosférico próximo a raízes de plantas de mangabeira, conforme descrito por Cabral (2012) e mantidos em tubos de ensaio contendo meio GL (glicose 10 g; extrato de levedura 2 g e ágar 15 g), a 5 °C.

**Figura 1-** Isolados fúngicos solubilizadores de fosfato, obtidos de solo rizosférico próximo a raízes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). A) MA2, B) MA5, C) MF1 e D) MF3.



Fonte: Elaboração do autor.

### 2.1 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

#### 2.1.1 Curva de produção de ácido indolacético (AIA) por fungos solubilizadores de fosfato

Quatro isolados fúngicos foram crescidos em meio BDA (infusão de 200 g de batata, dextrose 20 g e ágar 15 g), por três dias, a 30 °C. Posteriormente, discos com 5 mm de diâmetro, incluindo hifas e esporos, foram transferidos para tubos de ensaio (um disco por tubo), contendo meio DYGS líquido (glicose 2,0 g; peptona 1,5 g; extrato de levedura 2,0 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g) (RODRIGUEZ NETO; MALAVOLTA JUNIOR; VICTOR, 1986), suplementado com  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de triptofano.

As culturas permaneceram sob agitação constante (90 rpm), a 30 °C, por cinco dias. A produção de ácido indolacético (AIA) foi avaliada por meio do método colorimétrico descrito por Gordon e Weber (1951), tendo sido coletada uma amostra a cada dia para avaliação da produção de AIA e leitura do pH.

### *2.1.1.1 Curva de calibração de ácido indolacético (AIA)*

Uma solução estoque de AIA (Sigma®), preparada a 10 mM (1,75 mg mL<sup>-1</sup>) foi diluída em água destilada, em concentrações crescentes (0, 1, 3, 5, 7, 10, 25, 50, 100 e 150 µg mL<sup>-1</sup>) para a construção da curva de calibração de AIA, empregando o método descrito por Sarwar e Kremer (1995).

Uma alíquota de 1 mL de cada diluição foi transferida para tubos de ensaio, ao qual foi adicionado 2 mL do reagente Salkowski (1 mL de FeCl<sub>3</sub> – 1,35 g/10 mL e 50 mL de HClO<sub>4</sub> – 35%). Os tubos foram mantidos no escuro, por 30 min (HARTMANN; SINGH; KLINGMULLER, 1983). A coloração rósea foi o indicativo da presença do fitormônio, sendo quantificada pela leitura em espectrofotômetro (530 nm) em absorbância.

### *2.1.1.2 Síntese de ácido indolacético (AIA) por isolados fúngicos*

As amostras de cada isolado fúngico crescendo em meio DYGS, enriquecido com triptofano, foram coletadas durante cinco dias após a inoculação e centrifugadas (10.000 rpm) por 10 min a 10 °C. Em seguida, 1 mL do sobrenadante de cada isolado foi transferido para tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 2 mL do reagente Salkowski. Os tubos foram mantidos no escuro, por 30 min e a leitura feita em espectrofotômetro a 530 nm em absorbância. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Como controle foi utilizado o meio de cultura DYGS com triptofano.

A concentração de AIA foi determinada diariamente, durante cinco dias após a inoculação dos isolados fúngicos em meio suplementado com triptofano, utilizando a equação da curva padrão. Foi construída uma curva padrão para cada dia de avaliação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4 x 5 (quatro isolados fúngicos x cinco dias de avaliação), com três repetições, cada uma constituída por um tubo de ensaio. Os dados numéricos obtidos foram avaliados estatisticamente mediante a análise de variância e as médias analisadas por regressão, com o auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2011).

## **2.1.2 Avaliação qualitativa da produção de citocinina e giberelina por fungos solubilizadores de fosfato**

Para avaliar qualitativamente a produção de citocinina e giberelina pelos isolados fúngicos, foi utilizada uma adaptação do método sugerido por Letham (1971).

### *2.1.2.1 Cultivo dos isolados*

Os isolados fúngicos foram cultivados em meio BD, por quatro dias em rotação 90 rpm, com auxílio de agitador orbital – Shaker (Nova Técnica NT 712) a 30 °C. As culturas foram centrifugadas (4000 rpm por 5 min) e o sobrenadante filtrado em filtro estéril.

### *2.1.2.2 Germinação das sementes de rabanete e determinação qualitativa da produção de citocinina e giberelina*

Sementes de rabanete (*Raphanus sativus* L.) foram passadas em peneira com 2 mm de abertura (ABNT 10) e germinadas sobre folhas de papel “germitest” umedecidas em placas de Petri. Estas foram incubadas no escuro a 25 °C, por 35 h. Após a germinação, os hipocótilos e os cotilédones foram separados e transferidos para placas de Petri com papel “germitest” estéril umedecido com 4 mL do sobrenadante filtrado de cada isolado fúngico.

Foram utilizados 5 cotilédones e 5 fragmentos de hipocótilos padronizados para 3 mm, por repetição, os quais foram, em seguida, mantidos a 24 °C por 5 dias, sob luz fluorescente fraca contínua. O controle consistiu em papel “germitest” umedecido apenas com o meio BD esterilizado. Após 5 dias de incubação, foram avaliadas as seguintes características: comprimento médio (cm) do hipocótilo e peso da massa fresca e seco do hipocótilo e cotilédones.

Para avaliação qualitativa de giberelina e citocinina, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, contendo cinco tratamentos (MA2, MA5, MF1, MF3 e controle), contendo 3 repetições cada, constituída por uma placa de petri contendo 5 cotilédones e fragmentos de hipocótilo. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando as médias pelo teste de Tukey (5 %), utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2011).

### 2.1.3 Síntese de sideróforos

Os isolados fúngicos foram cultivados em frascos de penicilina contendo meio de cultura líquido triptocaseína de soja diluído (1/10), a 28 °C por 72 h, sob agitação a 90 rpm. A suspensão obtida foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 min, sendo transferido 1 mL do sobrenadante para tubos de ensaio esterilizados ao qual foi adicionado 1 mL da solução indicadora de cromoazurol S (CAS). A conversão da cor azul da solução CAS no sobrenadante para amarelo, no período de 15 min, indica que os isolados são produtores de sideróforos (SCHWYN; NEILANDS, 1987).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, contendo cinco tratamentos (MA2, MA5, MF1, MF3 e controle), cada um com 3 repetições, cada uma constituída por um tubo de ensaio. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando as médias pelo teste de Tukey (5%), utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2011).

## 2.2 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

### 2.2.1 Produção de amilase

Para o cultivo dos isolados fúngicos, três discos de 5 mm com crescimento micelial foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Amido (ágar 15 g L<sup>-1</sup> e amido solúvel 2 g L<sup>-1</sup>), as quais foram mantidas a 28 °C, por 72 h. Em seguida foi adicionado 3 mL de solução de lugol por placa e, após cinco minutos, a produção da enzima amilase foi detectada pela descoloração do meio em torno da colônia, formando um halo decorrente da hidrólise do amido (COON; JENNISON; WEEK, 1957).

### 2.2.2 Produção de catalase

Para verificar a produção da enzima catalase, discos de 5 mm de diâmetro, com crescimento micelial de cada isolado fúngico, foram adicionados aos frascos de penicilina (um disco por frasco) contendo meio GL (glicose 10 g L<sup>-1</sup> e extrato de levadura 2 g L<sup>-1</sup>) e mantidos a 28 °C, por 72 h sob agitação a 90 rpm. Para verificar a produção da enzima catalase, 15 µL de cada cultivo foram colocados sobre lâmina bacteriológica, na presença de 15 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

(30 %). Os isolados catalase-positivos exibiram intensa produção de bolhas (MARIANO et al., 2000).

### **2.2.3 Produção de celulase**

Para a superfície de placas de Petri contendo o meio de cultura triptocaseína de soja (TSA) suplementado com  $10 \text{ g L}^{-1}$  de celulose em pó, foram depositados disco de 5 mm de diâmetro com crescimento micelial de isolados fúngicos. Após um período de incubação de  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 72 h, 3 mL de solução vermelho congo a 0,5 % foram adicionados a cada placa, as quais permaneceram em temperatura ambiente por 15 min. O excesso da solução foi drenado e adicionado 10 mL de solução NaCl 1M por placa. Após 30 min, o excesso de NaCl foi drenado e os isolados com formação de halo de coloração alaranjada em torno da colônia foi considerado positivo para produção de catalase.

### **2.2.4 Produção de fosfatase**

Meio de cultura TSA (Ágar triptona soja) foi preparado e o pH ajustado para 7,3 antes da autoclavagem. Antes do meio TSA ser vertido, por placa foi adicionado 2 mL de difosfato de fenolftaleína (0,5 %), esterilizada por filtração com membrana de  $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ , para cada 100 mL de meio cultura. Discos de 5 mm de diâmetro com crescimento micelial de cada isolado foi depositado no centro das placas, que foram mantidas em estufa bacteriológica a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 72 h. Posteriormente, 3 mL de hidróxido de amônio (8,4 %) foi adicionado na tampa das placas de petri, que foram mantidas invertidas, em temperatura ambiente, por 15 min. A produção de fosfatase pelos isolados foi verificada pelo halo com coloração rósea, formado em torno das colônias (ROMEIRO, 2007).

### **2.2.5 Produção de pectinase**

Foi utilizado meio de cultura GL (glicose  $10 \text{ g L}^{-1}$ , extrato de levadura  $2 \text{ g L}^{-1}$  e ágar  $15 \text{ g L}^{-1}$ ) suplementado com  $10 \text{ g L}^{-1}$  de pectina. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5, antes da autoclavagem. Discos de 5 mm de diâmetro com crescimento micelial de cada isolado foi colocado sobre placas contendo o meio de cultura. Estas foram mantidas em estufa bacteriológica a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  por 72 h, quando foi adicionado 3 mL de solução de lugol por placa.

Após 15 min, os isolados que exibiram um halo mais claro ao redor da colônia, contrastando com o restante corado de marrom, foram considerados positivos para produção de pectinase.

### **2.2.6 Produção de protease**

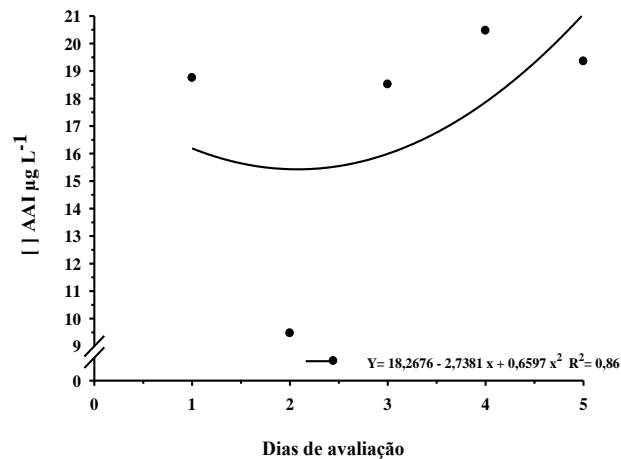
Foi utilizado meio de cultura constituído por 20 g L<sup>-1</sup> de caseína, 5 g L<sup>-1</sup> de peptona, 3 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 10 g L<sup>-1</sup> de glicose e 15 g L<sup>-1</sup> de ágar, com pH ajustado para 5 antes da autoclavagem. Discos de 5 mm de diâmetro com crescimento micelial dos isolados fúngicos foram adicionados sobre placas contendo o meio de cultura. As placas foram mantidas em estufa bacteriológica a 28 °C por 72 h. Os isolados positivos para produção de protease mostraram a formação de halo mais claro que o meio de cultura ao redor da colônia (STRAUSS et al., 2001).

Para os testes enzimáticos, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, contendo cinco tratamentos (MA2, MA5, MF1, MF3 e controle), cada um-com 3 repetições, constituída por uma placa de petri contendo discos de 5 mm de diâmetro com crescimento micelial dos isolados fúngicos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para síntese de auxina não houve interação entre os fatores dias de avaliação x isolados, apenas entre isolados. Para a avaliação quantitativa de AIA, a intensidade da coloração rósea, induzida por cada isolado, foi considerada o indicativo de maior ou menor produção. A quantificação de AIA produzida, independente do isolado, foi determinada utilizando a equação da curva de regressão linear ( $R^2 = 0,86$ ). A máxima produção pôde ser observada após 4 dias de incubação, com valor médio de  $20,47 \mu\text{g L}^{-1}$  (Figura 2).

**Figura 2-** Síntese de AIA por fungos solubilizadores de fosfato isolados de solo próximo a raízes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), ao longo de cinco dias de avaliação.



Fonte: Elaboração do autor.

A maior taxa de síntese de AIA foi produzida pelo isolado MA5, enquanto os menores valores foram obtidos com os isolados MA2 e MF3 (Tabela 1).

**Tabela 1-** Síntese de ácido indol acético (AIA) por fungos solubilizadores de fosfato, isolados de solo próximo a raízes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes).

Solubilizadores de fosfato	Síntese de AIA ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Solubilizadores de fosfato	Síntese de AIA ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
MA2	16,776 C $\pm$ 1,089	MF1	17,971 B $\pm$ 1,073
MA5	19,530 A $\pm$ 1,214	MF3	15,385 C $\pm$ 0,993
Valor de F	12,56*	CV (%)	11,05*

Nota: Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não difere entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.  $\pm$  erro padrão da média. \*Significativo a 5%. CV (%) = coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração do autor.

Como observado no presente trabalho, para os isolados de fungos de solo serem capazes de produzir AIA, outros autores também relatam esta habilidade para fungos do solo, como *Trichoderma asperellum* Q1, *Trichoderma atroviride* e *Penicillium menonorum* (BABU et al., 2015; GRAVEL; ANTOUN; TWEDDELL, 2007; LEI; Ya-q, 2015). A síntese de AIA pode ser realizada a partir de diferentes vias, tendo o triptofano o precursor mais comum na síntese microbiana. O triptofano pode ser naturalmente liberado em exsudatos das raízes de plantas e, com isso, a maior parte do AIA encontrado na rizosfera vem da biossíntese microbiana. A via de biossíntese independente de triptofano também tem sido detectada em outros microrganismos, como por exemplo o *Azospirillum* (LEI; Ya-q, 2015; XIE et al., 2005). No presente trabalho os isolados demonstram ter a via dependente de triptofano, já que o mesmo foi adicionado ao meio de cultura e ocorreu síntese de AIA, porém outros estudos são necessários para verificar se estes microrganismos também têm outras vias de biossíntese deste fitormônio.

Na avaliação qualitativa de citocinina e giberelina não foram detectadas influência dos isolados no comprimento médio de hipocótilo (Tabela 2). O isolado MF1 proporcionou maior peso da massa fresca dos hipocótilos, enquanto que para peso da massa seca de hipocótilos maior valor foi obtido pelo isolado MA2, MA5 e MF1.

**Tabela 2-** Comprimento médio de hipocótilos e peso da massa fresca e seca de hipocótilos de rabanete inoculados com o sobrenadante de fungos solubilizadores de fosfato, isolados de solo próximo a raízes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes).

Solubilizadores de fosfato	Comprimento médio de hipocótilos (cm)	Peso fresco de hipocótilos (g)	Peso seco de hipocótilos (g)
MA2	0,896 A ± 0,150	0,196 AB ± 0,005	0,016 A ± 0,000
MA5	0,869 A ± 0,120	0,204 AB ± 0,005	0,016 A ± 0,000
MF1	0,960 A ± 0,182	0,224 A ± 0,007	0,016 A ± 0,000
MF3	0,742 A ± 0,140	0,176 B ± 0,005	0,015 B ± 0,000
Controle	0,824 A ± 0,040	0,214 AB ± 0,000	0,015 B ± 0,000
Valor de F	1,09 <sup>ns</sup>	2,35*	1,00*
CV (%)	12,81	8,26	7,80

Nota: Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não difere entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. ± erro padrão da média. <sup>ns</sup>Não significativo. \*Significativo a 5%. CV (%) = coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração do autor.

Para peso da massa fresca de cotilédones não houve diferença entre a inoculação dos isolados, enquanto o maior peso de massa seca de cotilédones foi verificado para o isolado MA5 (Tabela 3). Contrariamente, a inoculação do isolado MF3 proporcionou menor peso da massa

fresca e seca de hipocótilo e seca de cotilédones (Tabelas 2 e 3).

**Tabela 3-** Peso da massa fresca e seca de cotilédones de rabanete inoculados com o sobrenadante de fungos solubilizadores de fosfato, isolados de solo próximo a raízes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes).

Solubilizadores de fosfato	Peso fresco de cotilédones (g)	Peso seco de cotilédones (g)
MA2	0,201 A ± 0,003	0,143 D ± 0,000
MA5	0,218 A ± 0,003	0,159 A ± 0,000
MF1	0,220 A ± 0,003	0,158 B ± 0,000
MF3	0,219 A ± 0,008	0,147 C ± 0,000
Controle	0,208 A ± 0,003	0,142 E ± 0,000
Valor de F	0,459 <sup>ns</sup>	1,09 <sup>*</sup>
CV (%)	8,44	6,05

Nota: Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna, não difere entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. ± erro padrão da média. <sup>ns</sup>Não significativo. <sup>\*</sup>Significativo a 5%. CV (%) = coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração do autor.

O aumento do peso da massa dos cotilédones está relacionado com isolados produtores de citocinina e giberelina, enquanto o aumento comprimento dos hipocótilos está relacionado com isolados produtores de giberelina. Com isso, no presente trabalho, destacam-se os MA5 e MF1 como possíveis produtores destes fitormônios, podendo ser indicados como inoculantes de plantas ou sementes, visto que a produção exógena de giberelina pode promover aumento da germinação de sementes e crescimento de mudas (LEI; Ya-q, 2015)

Entre as enzimas extracelulares, todos os isolados fúngicos mostraram resposta positiva para amilase, mas foram negativos para celulase (Tabela 4). O MF1 foi positivo para catalase, enquanto que apenas o isolado MF3 foi positivo para pectinase e protease.

**Tabela 4-** Avaliação qualitativa de produção de amilase, catalase, celulase, pectinase, protease, fosfatase e sideróforos, por fungos solubilizadores de fosfato, isolados de solo próximo a raízes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes).

Isolados	Enzimas Extracelulares						Sideróforos
	Amilase	Catalase	Celulase	Pectinase	Protease	Fosfatase	
MA2	+	-	-	-	-	+	-
MA5	+	-	-	-	-	+	-
MF1	+	+	-	-	-	+	-
MF3	+	-	-	+	+	+	-

Fonte: Elaboração do autor.

As enzimas amilase, protease, pectinase e celulase podem ser originárias de microrganismos, plantas e animais. Produzidas por bactérias ou fungos, as enzimas de origem microbiana podem representar a mais ampla classe de enzimas aplicadas no ramo da biotecnologia. Por sua vez, as enzimas pectinolíticas são produzidas em diferentes combinações pelas plantas e por microrganismos como fungos, leveduras e bactérias, sendo utilizadas nas indústrias de sucos de frutas (GRIEBELER et al., 2015). Os isolados fúngicos utilizados no presente trabalho, apenas não foram capazes de produzir a enzima celulase.

Tanto o isolado MF1 quanto o MF3 demonstraram produção de diferentes enzimas extracelulares (amilase, catalase, pectinase, protease e fosfatase). O mesmo foi relatado por Sousa, Soares e Garrido (2008) em isolados de estreptomicetos que tiveram produção das enzimas amilase, catalase, celulase, quitinase, xilanase e lipase. Os isolados MA2 e MA5, entretanto, produziram apenas duas enzimas cada um. Silva et al. (2011) tiveram maior índice de relação enzimática para protease e celulase em isolados de solo de sistemas agroflorestais. Enquanto o *Aspergillus nidulans* mostrou ser produtor apenas de amilase (SOARES et al., 2010). Alta atividade celulolítica de *Trichoderma reesei* QM9414 foi relatada por Basso, Gallo e Basso (2010) e o mesmo foi constatado para *Penicillium* sp. (NAMEIRAKPAM; PRABAKARAN; WAHAB, 2012).

Todos os isolados fúngicos mostram resposta positiva para atividade de fosfatase (Tabela 4). No entanto, estes já haviam sido avaliados quanto a capacidade de solubilização de fosfato de alumínio (Al), cálcio (Ca) e ferro (Fe) *in vitro*. Estes demonstram capacidade de disponibilizar fósforo (P) por meio de duas vias, pela solubilização de fosfato inorgânico, ocorrendo redução do pH (CABRAL, 2012) e pela mineralização, devido a síntese de enzimas fosfatases (ácida e básica), como observado no presente trabalho. A maior fonte de atividade de fosfatase no solo é de origem microbiana, promovendo hidrólise de P de fontes orgânicas (LEI; Ya-q, 2015). A fosfatase ácida está relacionada com a utilização de fosfatos orgânicos do solo, que não podem ser facilmente assimilados pelas plantas, na sua forma orgânica (ITO et al., 2015). Assim, as plantas liberam apenas a fosfatase ácida, enquanto os microrganismos podem produzir a ácida e alcalina (PANDEY et al., 2008).

Com isso, os microrganismos demonstram grande participação no ciclo do P, contribuindo para melhor nutrição das plantas, sendo uma vantagem sua utilização como inoculantes, uma vez que o P é encontrado no solo nas formas orgânicas e inorgânicas e apenas pode ser assimilado pelas plantas na sua forma solúvel. A forma inorgânica ocorre como fosfatos insolúveis de Ca, Fe e Al, enquanto as formas orgânicas são derivadas da decomposição de plantas, animais e microrganismos. Vários microrganismos são conhecidos

por serem solubilizadores de fosfato, disponibilizando as formas insolúveis de P por meio da atividade metabólica, quando exsudam ácidos orgânicos que acidificam o meio. Por outro lado, as fosfatases são capazes de transformar formas orgânicas de P em formas inorgânicas disponíveis para as plantas (PANDEY et al., 2008). Portanto, os isolados utilizados neste trabalho demonstram potencial na disponibilização nas formas insolúveis e de transformar formas orgânicas em inorgânicas de P, promovendo maior crescimento das plantas e reduzindo o uso de fertilizantes fosfatados.

Para produção de sideróforos, os isolados fúngicos não demonstraram capacidade de síntese deste composto, de acordo com o teste utilizado (Tabela 4), não dispondo desse método para o controle de patógenos de plantas.

Diversos microrganismos podem ter múltiplos mecanismos de promoção do crescimento vegetal, como encontrado neste trabalho, onde os isolados fúngicos demonstraram diferentes mecanismos potenciais de promotores de crescimento vegetal (Tabelas 1 e 4). Na literatura tal característica foi relatada para outros organismos, como o fungo *Discosia* sp., que tem como características a solubilização de fosfato, produção de fitase, sideróforos e ácido indolacético (RAHI et al., 2009), enquanto *Penicillium menonorum* produz ácido indol acético, sideróforos e solubiliza fosfato (BABU et al., 2015). O *Trichoderma asperellum* Q1 têm habilidade de solubilizar fosfato orgânico e inorgânico, com atividade de fosfatases e fitases, além de AIA, ácido giberélico e abscísico em meio líquido sem indutores (LEI; Ya-q, 2015). Sousa, Soares e Garrido (2008) observaram produção das enzimas amilase, catalase, celulase, quitinase, xilanase, lipase, AIA, sideróforo e solubilização de fosfato por isolados de estreptomicetos.

O isolado MA5 mostrou maior síntese do fitormônio AIA (Tabela 1), enquanto MF1 proporcionou os maiores pesos da massa fresca de hipocótilo e seca de cotilédones de rabanete (Tabela 2) e os MF1 e MF3 exibiram maior capacidade de produção de diferentes enzimas (amilase, catalase, pectinase e protease) (Tabela 4). Com isso, os isolados fúngicos estudados demonstraram características de interesse como promotores de crescimento vegetal por produção de fitormônios, e poderiam ser indicados como inoculantes. Ademais, por terem capacidade de produção de enzimas poderiam ser indicados para atuarem em processos como biorremediação, biodegradação, degradação de substâncias recalcitrantes e como agentes de controle de patógenos de plantas.

#### **4 CONCLUSÕES**

A maior produção de AIA foi detectada no isolado MA5.

Os isolados MF1 e MA5 proporcionaram maior crescimento de cotilédones e hipocótilos de rabanete.

Os isolados MF1 e MF3 demonstraram maior capacidade de produção de diferentes enzimas.

## REFERÊNCIAS

- AGUADO-SANTACRUZ, G. A.; MORENO-GÓMEZ, B.; JIMÉNEZ-FRANCISCO, B.; GARCÍA-MOYA, E.; PRECIANDO-ORTIZ, R. E. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. **Revista Fitotecnia Mexicana**, Chapingo, v. 35, n. 1, p. 9-21, 2012.
- AVELLANEDA-TORRES, L. M.; PULIDO, C. P. G.; ROJAS, E. T. Assessment of cellulolytic microorganisms in soils of Nevados Park, Colombia. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 45, n. 4, p. 1211-1220, 2014.
- BABU, A. G.; KIM, S. W.; YADAV, D. R.; HYUM, U.; ADHIKARI, M.; LEE, Y. S. *Penicillium menonorum*: A novel fungus to promote growth and nutrient management in Cucumber plants. **Mycobiology**, Seoul, v. 43, n. 1, p. 49-56, 2015.
- BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 45, n. 11, p. 1282-1289, 2010.
- CABRAL, J. S. R. **Otimização de parâmetros físicos-químicos e microbiológicos no estabelecimento *in vitro* de explantes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) e na sua promoção do crescimento**. 2012. 188 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde, 2012.
- CAMPOS, M. F.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Desenvolvimento de parte aérea de plantas de soja em função de reguladores vegetais. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 56, n. 1, p. 74-79, 2009.
- CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A. de; OLIVEIRA, A. N. de; WILLERDING, A. L. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 359-366, 2010.
- COON, H. J.; JENNISON, M. W.; WEEK, O. B. Routine tests for the identification of bacteria. In: (ed. Society of American Bacteriologists). **Manual of Microbiological Methods**, New York: McGraw-Hall, 1957. p. 239-262.
- DUBEY, S. K.; TRIPATHI, A. K.; UPADHYAY, S.N. Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 97, p. 2217-2224, 2006.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of Indoleacetic Acid. **Plant Physiology**, Rockville, v. 26, n. 1, p.192-195, 1951.
- GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R. J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, n. 8, p. 1968-1977, 2007.

GRIEBELER, N. E.; BORTOLI, V.; ASTOLFI, A. L.; DARONCH, N. A.; SCHUMANN, A. C.; SALAZAR, L. N.; CANSIAN, R. L.; BACKES, G. T.; ZENI, J. Seleção de fungos filamentosos produtores de amilases, proteases, celulases e pectinases. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, Curitiba, v. 13, p. 13-22, 2015.

HARTMANN, A.; SINGH, M.; KLINGMULLER, W. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indole acetic acid. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 29, n. 8, p. 916-923, 1983.

ITO, S.; NOZOYE, T.; SASAKI, E.; IMAI, M.; SHIWA, Y.; SHIBATA-HATTA, M.; ISHIGE-T.; FUKUI, K.; ITO, K.; NAKANISHI, H.; NISHIZAWA, N. K.; YAJIMA, S.; ASAMI, T. Strigolactone regulates anthocyanin accumulation, acid phosphatases production and plant growth under low phosphate condition in *Arabidopsis*. **Plos One**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. 1-17, 2015.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, 2007.

LEI, Z.; YA-qing, Z. Effects of phosphate solubilization and phytohormone production *Trichoderma asperellum* Q1 on promoting cucumber growth under salt stress. **Journal of Integrative Agriculture**, Beijing, v. 14, n. 8, p. 1588-1597, 2015.

LETHAM, D. S. Regulators of cell division in plant tissues – XII. A cytokinin bioassay using excised radish cotyledons. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 25, n. 3, p. 391-396, 1971.

MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A. Isolamento de bactérias para testes de antagonismo. In: MARIANO, R.L.R. (Coord.). **Manual de práticas em Fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000. p.115-119.

MOREIRA, A. L. L.; ARAÚJO, F. F. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* spp. como potenciais promotores de crescimento de *Eucalyptus urograndis*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 37, n. 5, p. 933-943, 2013.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

NAMEIRAKPAM, N.; D.; PRABAKARAN, J. J.; WAHAB, F. Phytochemical analysis and enzyme analysis of endophytic fungi from *Centella asiatica*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Haikou, v. 2, n. 3, p. 1280-1284, 2012.

OLIVEIRA, A. G.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; SANTOS, G. R.; MILLER, L. O.; CHAGAS, L. F. B. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 7, n. 3, p. 149-155, 2012.

PANDEY, A.; DAS, N.; KUMAR, B.; RINU, K.; TRIVEDI, P. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. isolated from soil samples of Indian Himalayan region. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 24, n. 1, p. 97-102, 2008.

- RADWAN, T. E. S. E. D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Aeração e adição de sais na produção de ácido acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 40, n. 10, p. 997-1004, 2005.
- RADWAN, T. E. S. E. D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 10, p. 987-994, 2004.
- RAHI, P.; VYAS, P.; SHARMA, S.; GULATI, A.; GULATI, A. Plant growth promoting potential of the fungus *Discosia* sp. FIHB 571 from tea rhizosphere tested on chickpea, maize and pea. **Indian Journal Microbiology**, Pune, v. 49, n. 2, p. 128-133, 2009.
- RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SMAIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2001.
- RODRIGUEZ NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V. A; VICTOR, O. Meio Simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 12, n. 1-2, p.32, 1986.
- ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2007. 172 p.
- SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, Malden, v. 20, n. 5, p. 282-285, 1995.
- SILVA, D. C. V.; TIAGO, P. V.; MATTOS, J. L. S.; PAIVA, L. M.; SOUZA-MOTTA, C. M. S. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 607-610, 2011.
- SCHWYN, B., NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 160, n. 1, p. 47-56, 1987.
- SOARES, I. A.; FLORES, A. C.; ZANETTIN, L.; PIN, H. K.; MENDONÇA, M. M.; BARCELOS, R. P.; TREVISOL, L. R.; CARVALHO, R. D.; SCHAUREN, D.; ROCHA, C. L. M. S.; BARONI, S. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 700-705, 2010.
- SOUSA, C. S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S. Characterization of streptomycetes with potential to promote plant growth and biocontrol. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 1, p. 50-55, 2008.
- STRAUSS, M. L. A.; JOLLY, N. P.; LAMBRECHTS, M. G.; VAN RESEMBURG, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 91, n. 1, p. 182-190, 2001.

TORTELLA, G. R.; RUBILAR, O.; GIANFREDA, L.; VALENZUELA, E.; DIEZ, M. C. Enzymatic characterization of Chilean native wood-rotting fungi for potential use in the bioremediation of polluted environments with chlophenols. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 24, n. 12, p. 2805-2818, 2008.

XIE, B.; XU, K.; ZHAO, H. X.; CHEN, S. F. Isolation of transposon mutants from *Azospirillum brasilense* Yu62 and characterization of genes involved in indole-3-acetic acid biosynthesis. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 248, n. 1, p. 57-63, 2005.

XU, J. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. **Molecular Ecology**, New York, v.15, n. 7, p.1713 -1731, 2006.

## CAPÍTULO 2

### ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE MANGABEIRA

**RESUMO:** A aclimatização é a etapa final e crítica da micropropagação, devido à dificuldade de readaptação das plantas ao ambiente *ex vitro*. A inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e microrganismos edáficos que possuem a habilidade de estimular o crescimento vegetal podem favorecer, na fase de aclimatização, a formação mais precoce da muda, com aumento da uniformidade e do crescimento das plantas, do sistema radicular e da parte aérea. Dentre as árvores frutíferas nativas do cerrado, a mangabeira se destaca como uma das mais promissoras para os programas de exploração sustentável. Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de substratos, a necessidade de câmara úmida, a inoculação de fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e do FMA *Glomus clarum* na aclimatização de plantas micropropagadas de mangabeira. Provenientes do terceiro subcultivo de segmentos nodais, obtidas de sementes preestabelecidas *in vitro*, as plantas no ensaio (I) foram aclimatizadas em cinco substratos (Bioplant<sup>®</sup>, solo, areia, areia + solo (1:1) e areia + solo + vermiculita (1:1)), na ausência ou presença de câmara úmida (copo plástico de 300 mL colocados invertidos sobre as plantas), em vasos. No ensaio (II), as plantas provenientes de sementes preestabelecidas *in vitro* foram aclimatizadas em vasos, testando três substratos (Bioplant<sup>®</sup>, solo e areia + solo + vermiculita (1:1)), na ausência ou presença de câmara úmida e quatro tratamentos de inoculação: FMA; FPCV; FMA + FPCV e controle. No ensaio (I), o substrato Bioplant<sup>®</sup> associado à câmara úmida foram os mais adequados, proporcionando os maiores valores para todas as variáveis: porcentagem de sobrevivência e enraizamento das plantas, comprimento médio da parte aérea, número médio de folhas, gemas, peso da massa fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular e comprimento médio da maior raiz. Enquanto no ensaio (II), a associação de câmara úmida com um dos substratos Bioplant<sup>®</sup> ou solo + areia + vermiculita e a inoculação com FMA, beneficiou a aclimatização das plantas micropropagadas. A co-inoculação de FMA + FPCV se destacou em condição de umidade relativa menor, ou seja, na ausência de câmara úmida.

**Palavras-chave:** *Hancornia speciosa* Gomes. Micropropagação. Cerrado. Substrato. Câmara úmida. Solubilização de fosfato. Fitormônio.

## 1 INTRODUÇÃO

A aclimatização é a fase da micropropagação considerada crítica, pois envolve a passagem da planta de uma condição *in vitro* (mixotrófica) para *ex vitro* (autotrófica). Nesta fase as plantas micropropagadas são suscetíveis ao estresse hídrico, devido à formação incompleta dos estômatos (ainda não funcionais) e ao pouco desenvolvimento da cutícula das folhas. Da mesma forma, mostram baixa eficiência fotossintética, absorção de nutrientes e defesa contra patógenos e pragas (OLIVEIRA et al., 2010; SCHUCK et al., 2012; SILVA, L et al., 2006).

As plantas obtidas por meio da micropropagação são sensíveis às variações externas, exigindo cuidados durante seu manejo para que não ocorram perdas. Estas são dependentes da fertilidade do substrato, que devem garantir a manutenção mecânica do sistema radicular, estabilidade da planta, pH adequado, suprimento de água, nutrientes e trocas gasosas entre as raízes e o ar atmosférico (ROCHA et al., 2008; SANTOS et al., 2006; SOARES et al., 2009).

Uma das técnicas utilizadas para diminuir perdas de plantas é a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) na fase de aclimatização. Eles beneficiam o crescimento de espécies arbóreas em viveiro, por proporcionar maior crescimento, sobrevivência, uniformidade e formação precoce da muda, proteção contra estresses bióticos e abióticos, melhor desenvolvimento do sistema radicular, parte aérea e estabelecimento de uma comunidade rizosférica benéfica (ANZANELLO; SOUZA; CASAMALI, 2011; SAMPAIO FILHO et al., 2012; SILVA, M et al., 2006).

Como alternativa para estimular o enraizamento durante a etapa de aclimatização, pode-se utilizar microrganismos promotores do crescimento vegetal (MAFIA et al., 2005; SILVA et al., 2006), que estão relacionados à produção de fitormônios como auxinas, citocinina e giberelina, assim como de ácidos lácticos, succínicos e sideróforos (FARRAG; ABEER; DARWESH, 2011; ZHAO; ZHANG, 2015). A inoculação de microrganismos solubilizadores de fosfato, aliados ou não a outros microrganismos benéficos do solo, pode incrementar ainda mais o desenvolvimento vegetal (FREY-KLETT; GARBAYE; TARKKA, 2007).

A utilização do substrato adequado durante a aclimatização reduz a mortalidade e influencia as respostas das plantas dependendo de suas características físicas, químicas e biológicas. Ele pode aumentar a porcentagem de sobrevivência, enraizamento e crescimento das mudas (MOREIRA et al., 2006; PEREIRA et al., 2005; SILVA et al., 2007), garantindo que as mudas cheguem ao setor produtivo de forma mais rápida e barata (OLIVEIRA; COSTA; PEREIRA, 2008).

Entre as árvores frutíferas nativas do cerrado, a mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) se destaca como uma das mais promissoras para programas de exploração sustentável e reflorestamento de áreas degradadas. A incorporação da mangabeira em sistemas hortícolas tem sido proposta como um meio para contribuir à conservação e, também, reduzir a pobreza em áreas em que está frutífera é nativa e cresce satisfatoriamente (ANJOS et al., 2009; CALDAS et al., 2009).

Seus frutos são consumidos in natura ou processados no preparo de geleias, sorvete, licor, doce e sucos. O látex é utilizado na medicina tradicional e a madeira na carpintaria, confecção de caixas e produção de carvão (ANJOS et al., 2009; BARROS et al., 2010; ENDRINGER; PEZZUTO; BRAGA, 2009; FERREIRA et al., 2007; MARINHO et al., 2011; SAMPAIO; NOGUEIRA, 2006; SANTOS et al., 2009). A borracha tem potencial de uso industrial, com boas características físico-mecânicas, com aplicações comerciais, como impermeabilização de tecidos e confecção de bolas (MACHADO et al., 2004).

Apesar de ter grande potencial para exploração econômica, a falta de informações sobre essa cultura vem restringindo seu cultivo comercial, tornando seu aproveitamento limitado a pequenos produtores e a exploração extrativista. Ademais, por suas mudas terem crescimento lento, comum em árvores do cerrado, esta característica reduz o interesse na propagação da mangaba (SANTOS et al., 2010; SOARES et al., 2007; 2009). Suas sementes têm curta longevidade, por serem recalcitrantes, sendo necessário que a semeadura aconteça logo após a extração do fruto, além do seu mesocarpo ter ação inibitória sobre a germinação (BARROS et al., 2010).

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de substratos, necessidade de câmara úmida, inoculação de fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e do FMA *Glomus clarum* na aclimatização de plantas micropropagadas de mangabeira.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL

Frutos de mangabeira de diferentes formas, tamanhos e colorações foram coletados de diferentes plantas de mangabeira (Figura 1), na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da UNESP - Universidade Estadual Paulista, Campus de Ilha Solteira-SP. A despolpa dos frutos foi realizada manualmente, com o auxílio de peneira de alumínio malha nº 55. As sementes foram lavadas sob água corrente, para retirar o excesso de mesocarpo aderido e, em seguida, imersas por 1 minuto em álcool 70 % (v/v) e 30 minutos em solução de cloro ativo (1 %), seguido de triplo enxágue com água destilada e autoclavada em câmara de fluxo laminar.

**Figura 1-** Planta matriz de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) com frutos (A) e (B), detalhe de suas flores (C), diferentes colorações e pigmentação dos frutos (D) e tamanho dos frutos (E). Barra= 10 mm.



Fonte: Elaboração do autor.

### 2.2 ESTABELECIMENTO DE SEMENTES E MULTIPLICAÇÃO *in vitro*

Para o estabelecimento *in vitro*, as sementes foram transferidas para tubo de ensaio (25 x 150 mm) contendo 20 mL de meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), modificado para metade da concentração original dos sais (MS ½), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 3,5 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,03 antes da autoclavagem. Os tubos contendo as sementes foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 h, temperatura de 25 ±

3°C, umidade relativa de 45 a 46 % e radiação fotossintética ativa de 45 - 55  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Para a fase de multiplicação, os explantes obtidos de sementes de mangabeira germinadas *in vitro* foram transferidos para tubos de ensaio contendo 20 mL de meio de cultivo WPM (LLOYD; McCOWN, 1980), modificado para metade da concentração original dos sais (WPM ½), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 3,5 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado para  $5,7 \pm 0,03$  antes da autoclavagem e os tubos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento.

### Ensaio I – Aclimatização de plantas de mangabeira em substratos e presença e ausência de câmara úmida

Plantas de mangabeira provenientes do terceiro subcultivo de segmentos nodais, contendo duas gemas laterais, obtidas de sementes preestabelecidas *in vitro*, sem raízes, foram retiradas dos tubos e colocadas em bandeja contendo água destilada. Posteriormente, foram transplantadas para vasos plásticos (10,2 x 7,8 x 7,8 cm; 415 mL) contendo os seguintes substratos: Bioplant®, solo (Latosolo Vermelho Distroférico), areia, areia + solo (1:1) e areia + solo + vermiculita (1:1), com características químicas, físicas e nutricionais apresentadas na Figura 2 e Tabelas 1, 2 e 3, em ausência e presença de câmara úmida (copos plásticos transparentes de 300 mL foram colocados invertidos sobre as plantas)

**Figura 2-** Plantas micropropagadas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aclimatizadas em substratos: Bioplant® (A); Solo (B); Areia (C); Areia + Solo (D); Areia + Solo + Vermiculita (E); Copos plásticos como câmara úmida (F) e vasos com presença ou ausência de câmara úmida (G). Barra= 10 mm.



Fonte: Elaboração autor.

**Tabela 1-** Características químicas dos substratos utilizados na aclimatização de plantas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), em presença ou ausência de câmara úmida, em casa de vegetação.

Substratos	MO	P <sub>(resina)</sub>	pH	K	Ca	Mg	H+Al	SB	CTC	V
	g dm <sup>-3</sup>	mg dm <sup>-3</sup>	.....mmolc dm <sup>-3</sup> .....							%
Areia (A)	7,0	7,0	6,1	0,3	2,0	2,0	8,0	4,3	12,3	35,0
Solo (S)	40,0	24,0	6,2	3,9	76,0	28,0	22,0	107,9	129,9	83,0
A+S	21,0	19,0	6,2	2,4	50,0	20,0	15,0	72,4	87,4	83,0
A+S+Verm	16,0	16,0	6,6	1,8	30,0	56,0	12,0	87,8	99,8	88,0
Bioplant <sup>®</sup>	115,0	217,0	6,0	15,4	67,0	71,0	22,0	153,4	175,4	87,0

Fonte: Elaboração do autor.

**Tabela 2-** Características físicas dos substratos utilizados na aclimatização de plantas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), em presença ou ausência de câmara úmida, em casa de vegetação.

Substratos	Areia	Silte	Argila
	.....g kg <sup>-1</sup> .....		
Areia (A)	990	3	7
Solo (S)	489	163	348
Areia + Solo	780	56	164
Areia + Solo + Vermiculita	814	49	137

Fonte: Elaboração do autor.

**Tabela 3-** Características nutricionais do substrato Bioplant<sup>®</sup> utilizado na aclimatização de plantas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), em presença ou ausência de câmara úmida, em casa de vegetação.

Substrato	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	.....g kg <sup>-1</sup> .....						.....mg kg <sup>-1</sup> .....				
Bioplant <sup>®</sup>	5,5	4,5	2,0	8,6	5,4	8,3	22	20	18212	291	60

Fonte: Elaboração do autor.

Os vasos contendo as plantas foram mantidos em casa de vegetação, com irrigação manual, duas vezes ao dia, com temperatura de  $26 \pm 3$  °C e umidade relativa de 30 a 35 %. Após 60 dias os copos plásticos foram retirados, mas as plantas permaneceram nas mesmas condições descritas anteriormente. Ao final de 120 dias foi avaliado porcentagem de sobrevivência e enraizamento das plantas, comprimento médio da parte aérea e maior raiz, número médio de folhas, gemas, peso da massa fresca e seca de parte aérea e de raízes.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 2 x 5 (ausência ou presença de câmara úmida x substratos), com 20 repetições cada tratamento, cada uma constituída por um vaso com uma planta. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando as médias pelo teste Tukey (5 %), utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2011).

## **Ensaio II – Inoculação de fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e do fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Glomus clarum* em plantas de mangabeira**

Três isolados de FPCV (MA2, MA5 e MF3), pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia Agrícola do Instituto Federal Goiano, *Campus* Rio Verde, GO foram obtidos de solo próximo a raízes de plantas de mangabeira e mantidos em tubos de ensaio contendo meio de cultura GL (glicose 10 g; extrato de levedura 2 g e ágar 15 g), a 5 °C.

Preparou-se uma mistura dos três isolados de FPCV, os quais foram cultivados em erlenmeyer de 125 mL, separadamente, contendo meio líquido GL (glicose 10 g e extrato de levedura 2 g) e incubados a 28 °C por 72 h. Para a contagem direta foram feitas diluições sucessivas e plaqueamento nas diluições  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ , com 3 repetições e incubação a 28 °C por 72 h. Os inoculantes foram padronizados para  $10^8$  ufc mL<sup>-1</sup> e misturados na relação 1:1 (v:v) no momento da inoculação das mudas.

O inoculante micorrízico foi constituído por *G. clarum*, procedente da coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal de Lavras - MG, e doada à UNESP- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia, Campus de Ilha Solteira.

As plantas de mangabeira provenientes de segmentos nodais, do terceiro sub-cultivo, obtidos de sementes preestabelecidas *in vitro*, foram aclimatizadas em três substratos (Bioplant®, solo e areia + solo + vermiculita (1:1)), em ausência e presença de câmara úmida (copo plástico de 300 mL, colocado sobre as plantas nos vasos) e quatro tratamentos de inoculação: FMA; FPCV; FMA + FPCV e controle (ausência de inoculação).

A inoculação do FMA ocorreu no orifício de transplantio, com 3,3 g de inóculo de FMA (10 esporos mL<sup>-1</sup> de solo). Para a inoculação dos FPCV, 1 mL de inoculante líquido da mistura destes isolados, com  $10^8$  ufc mL<sup>-1</sup>, foi pipetado no colo de cada planta, após o transplantio.

Os vasos plásticos (10,2 x 7,8 x 7,8 cm; 415 mL) contendo as plantas foram mantidos em casa de vegetação, com irrigação manual duas vezes ao dia, no volume de 15 mL, com temperatura de  $26 \pm 3$  °C e umidade relativa de 30 a 35 %. Após 60 dias os copos plásticos foram retirados e as plantas mantidas nas mesmas condições ambientais descritas

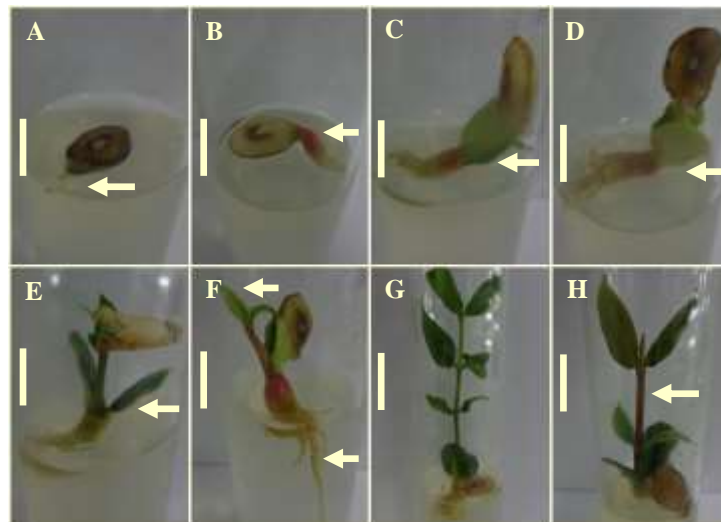
anteriormente. Ao final de 120 dias elas foram avaliadas para porcentagem de sobrevivência, enraizamento das plantas, comprimento médio da parte aérea, maior raiz, número médio de folhas, gemas, peso da massa fresca e seca da parte aérea e raízes e a relação peso da massa seca das raízes/peso da massa seca de parte aérea (PMSR/PMSP),

O delineamento foi inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 2 x 3 x 4 (ausência e presença de câmara úmida x substratos x tratamentos de inoculação), com 20 repetições cada tratamento, cada uma constituída por um vaso com uma planta, totalizando 480 unidades experimentais. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando as médias pelo teste Scott-Knott (5 %), utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2011).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação *in vitro* das sementes de mangabeira com a emissão da radícula ocorreu entre 10 e 15 dias após a transferência para o meio de cultivo (Figura 3A e 3B), seguido da emissão dos cotilédones foliares aos 20 dias (Figuras 3C, 3D e 3E). A emergência do epicótilo aconteceu aos 30 dias (Figura 3F), tendo este coloração avermelhada, característica também descrita por Cabral et al. (2013) e Léo et al. (2007). As plantas (Figura 3G e 3H) obtidas foram mantidas *in vitro* para obtenção de explantes.

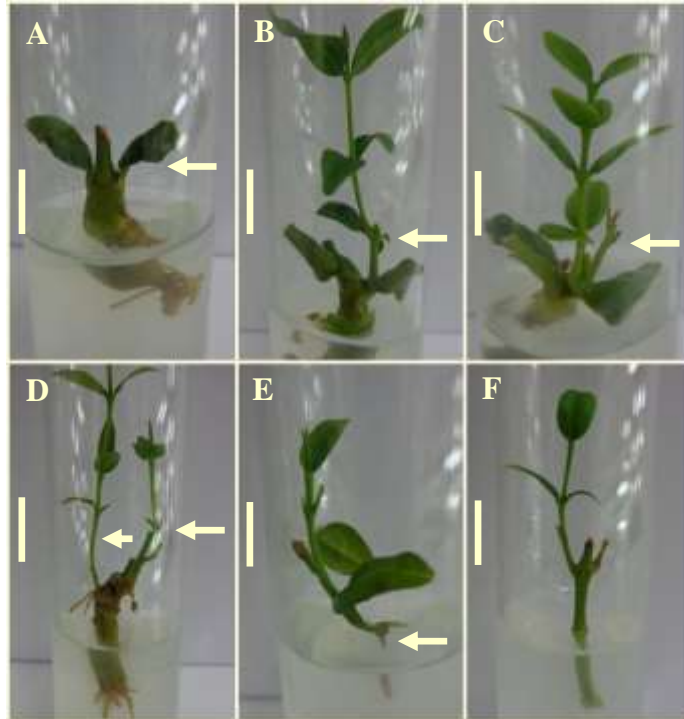
**Figura 3-** Início da germinação das sementes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) *in vitro* (A), coloração vermelha do hipocótilo (B), início da emergência dos cotilédones foliares (C e D), cotilédones totalmente emergidos (E), primeiras folhas emergidas e presença de raízes adventícias (F), planta com 60 dias de cultivo *in vitro* (G) e com coloração vermelha no caule, característica da espécie (H). Barra= 10 mm.



Fonte: Elaboração do autor.

Após o primeiro sub-cultivo, os cotilédones foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio de cultivo, para dar origem a novas brotações laterais (Figura 4 A). O mesmo procedimento foi realizado por mais dois sub-cultivos (intervalo de 30 dias entre os sub-cultivos). O número de brotações laterais foi de uma ou duas por cotilédones, sendo essas as mais vigorosas (Figuras 4B, 4C e 4D). As plantas bem formadas, vigorosas, com coloração verde-escura bem acentuada, característica da espécie, contendo ou não formação de raízes adventícias (Figuras 4E e 4F), foram escolhidas para a fase de aclimatização.

**Figura 4-** Cotilédones foliares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) após o primeiro sub-cultivo (A), cotilédones com uma brotação lateral (B e C), cotilédones com duas brotações laterais (D), plantas com presença (E) e ausência (F) de raiz adventícia aos 120 dias de cultivo *in vitro*. Barra= 10 mm.



Fonte: Elaboração do autor.

### **Ensaio I – Aclimatização de plantas de mangabeira em substratos em presença e ausência de câmara úmida.**

O emprego da câmara úmida foi essencial para garantir a sobrevivência e crescimento das mudas nos diferentes substratos, exceto para o substrato solo (Tabela 4). Este exibiu tanto a maior porcentagem de sobrevivência quanto de enraizamento na ausência de câmara úmida (13,3 % para ambas).

Na presença da câmara úmida, o Bioplant<sup>®</sup> e a areia + solo proporcionaram maior sobrevivência de plantas (42,1 e 32,9 %, respectivamente), enquanto a maior porcentagem de enraizamento (50,8 %) foi observada no Bioplant<sup>®</sup>. A areia, como substrato, na ausência de câmara úmida, acarretou na perda de todas as plantas de mangabeira, devido a baixa retenção de água.

**Tabela 4-** Porcentagem de sobrevivência e enraizamento de plantas micropropagadas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aclimatizadas em substratos, na presença ou ausência de câmara úmida.

Substratos	Câmara úmida			
	Ausência	Presença	Ausência	Presença
	Sobrevivência (%)		Enraizamento (%)	
Solo	13,3 Aa	9,8 Bb	13,3 Aa	6,6 Bb
Areia	0,0 Bb	13,3 Ba	0,0 Bb	13,3 Ba
Bioplant®	6,6 Bb	42,1 Aa	6,6 Bb	50,8 Aa
Areia + solo	6,6 Bb	32,9 Aa	6,6 Bb	29,7 Ba
Areia + solo + verm	6,6 Bb	16,5 Ba	6,6 Bb	16,5 Ba
Valor de F	2,44*		4,36*	
CV (%)	92,27		84,38	

Nota: Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, para cada variável, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott. Verm= vermiculita. \*Significativo a 5%. CV (%)= coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração do autor.

Na ausência da câmara úmida, a perda de umidade pela planta é maior, culminando em maior absorção desta, presente no substrato. Como o substrato solo armazena maior teor de água tende a compensar a maior perda de água pela planta por meio da evapotranspiração. Isso ocorre devido o substrato solo utilizado exibir alta microporosidade (Tabela 2), com os maiores teores de silte e argila quando comparado aos outros, sendo esta a característica responsável pela maior taxa de retenção de água (SUGUINO et al., 2011). Com isso as plantas de mangabeira aclimatizadas utilizando substrato solo tiveram as melhores médias de crescimento em condições de teor de umidade baixo (ausência de câmara úmida).

Para porcentagem de sobrevivência, enraizamento, comprimento médio de parte aérea e maior raiz, número médio de folhas, gema e peso da massa fresca e seca da parte aérea e raiz das plantas ocorreu interação substratos x câmara úmida (Tabelas 4, 5 e 6). Com a utilização de câmara úmida as maiores porcentagens de sobrevivência das plantas de mangabeira ocorreram na presença de substratos com maior macroporosidade e menor capacidade de retenção de água como o Bioplant® e areia + solo (Tabelas 1 e 2).

Com a menor perda de água na presença da câmara úmida, no substrato solo, em decorrência da sua maior capacidade de armazenamento de água e, possivelmente, pela baixa aeração para as raízes e favorecimento da proliferação de fungos, constatou-se morte das mudas ou comprometimento no enraizamento (Tabela 4). A maior porcentagem de enraizamento, com formação de maior volume de raízes adventícias, foi obtida utilizando Bioplant® mais câmara úmida (Figura 5).

**Tabela 5-** Comprimento médio da parte aérea, número médio de folhas, gemas e comprimento médio da maior raiz de plantas micropropagadas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aclimatizadas em substratos, em presença ou ausência de câmara úmida, em casa de vegetação.

Substratos	Câmara úmida			
	Ausência	Presença	Ausência	Presença
	Comprimento médio da parte aérea (cm)		Número médio de folhas	
Solo	2,12 Aa	1,15 Ba	2,00 Aa	0,87 Ba
Areia	0,00 Bb	3,50 Ba	0,00 Bb	3,75 Ba
Bioplant®	1,30 Ab	10,50 Aa	1,25 Ab	9,12 Aa
Areia + solo	0,90 Ab	4,80 Ba	0,50 Ab	5,25 Ba
Areia + solo + verm	0,97 Aa	2,86 Ba	2,50 Aa	3,37 Ba
Valor de F	5,17*		2,90*	
CV (%)	82,86		101,21	
	Número médio de gemas		Comprimento médio da maior raiz (cm)	
Solo	4,50 Aa	2,25 Ba	4,02 Aa	1,08 Bb
Areia	0,00 Bb	13,00 Aa	0,00 Bb	2,77 Ba
Bioplant®	2,50 Ab	16,50 Aa	1,60 Bb	12,02 Aa
Areia + solo	1,00 Ab	11,75 Aa	0,00 Bb	5,76 Ba
Areia + solo + verm	5,00 Aa	6,25 Ba	1,92 Bb	4,63 Ba
Valor de F*	3,71*		3,69*	
CV (%)	86,18		106,13	

Nota: Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, para cada variável, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott. verm= vermiculita. \*Significativo a 5%. CV (%)= coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração do autor.

As partículas com maior diâmetro que constituem um substrato são responsáveis pela formação de poros maiores (macroporos), que são ocupados pelo ar e tem influência direta sobre o crescimento das raízes, enquanto as partículas de menor diâmetro são responsáveis pela formação de poros menores (microporos), que são ocupados por água (SCHUCK et al., 2012), o que justifica a diferença dos resultados para porcentagem de sobrevivência e enraizamento entre os substratos Bioplant® e solo, em presença e ausência de câmara úmida (Tabela 4).

Para comprimento médio da parte aérea, número médio de folhas e gemas, entre os substratos, na ausência de câmara úmida, a areia foi inferior aos outros substratos, tendo ocorrido morte de todas as plantas aclimatizadas de mangabeira neste substrato, enquanto os demais substratos não diferiram entre si (Tabela 5). Para o comprimento da maior raiz, o substrato solo proporcionou o maior valor. Utilizando câmara úmida, o Bioplant® proporcionou as maiores médias para comprimento médio de parte aérea, número médio de folhas e

comprimento médio da maior raiz. Para o número médio de gemas, os maiores valores foram observados para areia, Bioplant® e areia + solo.

**Tabela 6-** Peso da massa fresca e seca de parte aérea e raízes de plantas micropropagadas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aclimatizadas em substratos, em presença ou ausência de câmara úmida, em casa de vegetação.

Substratos	Câmara úmida			
	Ausência	Presença	Ausência	Presença
	Massa fresca da parte aérea (g)		Massa fresca das raízes (g)	
Solo	0,040 Aa	0,022 Ba	0,014 Aa	0,016 Ba
Areia	0,000 Aa	0,071 Ba	0,000 Aa	0,009 Ba
Bioplant®	0,028 Ab	0,730 Aa	0,007 Ab	0,395 Aa
Areia + solo	0,008 Aa	0,099 Ba	0,000 Aa	0,022 Ba
Areia + solo + verm	0,033 Aa	0,073 Ba	0,004 Aa	0,022 Ba
Valor de F	4,73*		4,79*	
CV (%)	173,70		220,62	
	Massa seca da parte aérea (g)		Massa seca das raízes (g)	
Solo	0,014 Aa	0,007 Ba	0,012 Aa	0,005 Ba
Areia	0,000 Aa	0,016 Ba	0,000 Aa	0,009 Ba
Bioplant®	0,009 Ab	0,231 Aa	0,004 Ab	0,126 Aa
Areia + solo	0,002 Aa	0,029 Ba	0,000 Aa	0,013 Ba
Areia + solo + verm	0,009 Aa	0,022 Ba	0,002 Aa	0,008 Ba
Valor de F	4,64*		5,31*	
CV (%)	182,09		179,14	

Nota: Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, para cada variável, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott. verm= vermiculita. \*Significativo a 5%. CV (%)= coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração do autor.

**Figura 5-** Formação de raízes em plantas micropropagadas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aclimatizadas em Bioplant®, com presença de câmara úmida, em casa de vegetação.



Fonte: Elaboração do autor.

Os maiores valores médios, de comprimento médio da parte aérea, número médio de folhas e gemas foram obtidos com os substratos areia, Bioplant<sup>®</sup> e areia + solo com a utilização da câmara úmida. Para comprimento médio da maior raiz apenas o substrato solo obteve menor valor médio, na presença de câmara úmida. A formação do sistema radicular das plantas de mangabeira foi influenciada pelos substratos e pela presença ou ausência de câmara úmida (Tabela 5). O principal efeito da utilização do substrato adequado durante a fase de aclimatização é na formação de raízes, o que permitirá, conseqüentemente, no aumento do crescimento da parte aérea das plantas (COUTO; WAGNER JÚNIOR; QUEZADA, 2003).

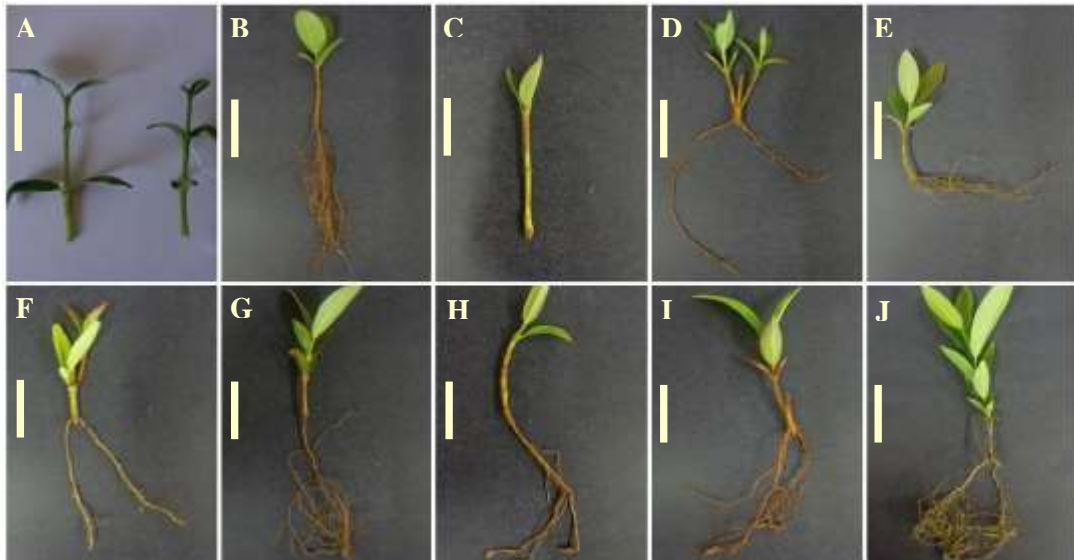
Para o peso da massa fresca e seca da parte aérea e raízes, não houve diferença quando na ausência de câmara úmida. Entre a presença e ausência de câmara úmida, os maiores valores para peso da massa fresca e seca da parte aérea e raízes foram observados no substrato Bioplant<sup>®</sup>, com câmara úmida (Tabela 6).

Plantas de mangabeira no momento da aclimatização tinham em média duas gemas e nenhuma raiz (Figura 6A). As que foram aclimatizadas em ausência de câmara úmida, no substrato areia, não sobreviveram. Em substrato solo tiveram maior formação de raízes adventícias e de novas folhas expandidas (Figura 6B). Algumas plantas no substrato areia + solo, não tiveram bom crescimento, com ausência de formação de raízes, novas folhas e com entrenós longos, permanecendo com aspecto parecido ao dos explantes utilizados inicialmente para a aclimatização (Figuras 6A e 6C).

No substrato areia + solo + vermiculita ocorreu formação de brotações, menor número de raízes adventícias, tendo uma única raiz principal e formação de folhas expandidas (Figura 6D). No Bioplant<sup>®</sup>, as plantas exibiram grande número de raízes adventícias, formação de folhas expandidas, com coloração avermelhada, característica da espécie (Figura 6E).

As plantas de mangabeira mostraram maior crescimento na presença de câmara úmida, enquanto que as cultivadas no substrato areia foram menores e de coloração verde clara, com pigmentação vermelha nas folhas, duas raízes principais, sem formação de raízes adventícias (Figura 6F). Em substrato solo, as folhas ficaram expandidas, com presença de raízes adventícias (Figura 6G). No tratamento com areia + solo elas mostraram-se estioladas, com menor número de folhas expandidas, entrenós longos e menor formação de raízes (Figura 6H). Na mistura areia + solo + vermiculita, com folhas expandidas, existiu formação de raízes adventícias e entrenós curtos (Figura 6I). No substrato Bioplant<sup>®</sup>, as plantas mostraram maior formação de folhas expandidas grandes, entrenós curtos e grande volume de raízes adventícias (Figura 6J).

**Figura 6-** Plantas micropropagadas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aclimatizadas em substratos, em presença e ausência de câmara úmida, em casa de vegetação. Explantes de mangaba utilizados para a aclimatização (A). Substratos com ausência de câmara úmida: Solo (B); Areia + Solo (C); Areia + Solo + Vermiculita (D); Bioplant® (E). Substratos com presença de câmara úmida: Areia (F); Solo (G); Areia + Solo (H); Areia + Solo + Vermiculita (I) e Bioplant® (J). Barra= 10 mm.



Fonte: Elaboração do autor.

Para todas as variáveis avaliadas, no substrato Bioplant® foram verificados os maiores valores quando associado à câmara úmida. Esses resultados podem estar relacionados com a maior exigência de umidade pelas mudas de mangabeira, uma vez que as plantas micropropagadas são muito sensíveis à desidratação durante a aclimatização. Alguns autores citam que a transferência das condições *in vitro* com elevada umidade, para *ex vitro* com baixa umidade, entre outros fatores, resulta em perdas de plantas, devido ao dessecamento e ao menor crescimento das que sobrevivem (BRAGA et al., 2011; MOREIRA et al., 2006; ROCHA et al., 2009). Tal resultado foi observado por Lima et al. (2007) que, trabalhando com *Mentha viridis*, onde as microestacas da espécie foram mantidas em casa de vegetação com 70% de umidade relativa do ar, e relatada por Locatelli, Vitovski e Lovato (2002), que mantiveram mudas de macieira durante a aclimatização sob alta umidade relativa do ar, próximo a 100%.

Desta forma, para a aclimatização de plantas micropropagadas de mangabeira, o substrato Bioplant® na presença de câmara úmida foi o mais adequado, proporcionando os maiores comprimentos médio da parte aérea, número médio de folhas, gemas, massa fresca e seca de parta aérea e raízes, comprimento médio da maior raiz, porcentagem de sobrevivência

e enraizamento. Estes resultados, possivelmente, devem-se ao fato do substrato ter características físicas (maior macroporosidade) e químicas (matéria orgânica e nutrientes) adequadas para o crescimento e desenvolvimento de mudas.

### **Ensaio II – Inoculação de fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e do fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Glomus clarum* em plantas de mangabeira**

A porcentagem de sobrevivência, enraizamento e a relação PMSR/PMSP das mudas de mangabeira foi influenciada pelo tipo de substrato e pela interação câmara úmida. x tratamentos de inoculação (Tabelas 7 e 8). O Bioplant<sup>®</sup> foi o substrato que proporcionou a maior porcentagem de sobrevivência, enquanto que para porcentagem de enraizamento e para a relação PMSR/PMSP as melhores médias foram verificadas para os substratos Bioplant<sup>®</sup> e solo + areia + vermiculita (Tabela 7).

O melhor desempenho das mudas no Bioplant<sup>®</sup> e solo + areia + vermiculita, pode ser elucidado pela maior porcentagem de enraizamento nestes substratos (Tabela 7). A alta porosidade dos substratos deve ter favorecer o enraizamento das mudas, proporcionando sistema radicular mais ramificado, parte aérea com emissão de novas folhas e expansão das existentes (LOPES et al., 2008). O Bioplant<sup>®</sup> apresentou um ganho de 196, 193 e 300 % na sobrevivência das mudas, enraizamento e relação massa seca de raízes/massa seca de parte aérea, respectivamente, comparado ao substrato solo. Tal resultado deve-se ao fato de substratos formados por um único material não ter suficientes espaços de aeração associado à elevada capacidade de retenção de água, características necessárias para a aclimatização de plantas micropropagadas (Tabela 7).

**Tabela 7-** Porcentagem de sobrevivência, enraizamento e relação peso da massa seca das raízes/peso da massa seca da parte aérea (PMSR/PMSP) de mudas micropropagadas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aclimatizadas em substratos, em casa de vegetação.

Substratos	Sobrevivência (%)	Enraizamento (%)	PMSR/PMSP
Solo	9,4 C	25,0 B	0,13 B
Bioplant <sup>®</sup>	27,8 A	73,4 A	0,52 A
Solo + areia + verm	19,2 B	61,1 A	0,48 A
Valor de F	10,73*	8,03*	3,15*
CV (%)	60,9	67,1	53,0

Nota: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre substratos na coluna, para casa variável, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott. verm.=vermiculita. \*Significativo a 5%. CV (%)= coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração do autor.

Os produtores, usualmente, utilizam uma mistura de substratos durante a aclimatização, ou um substrato comercial, devido sua uniformidade de composição química, física e capacidade de retenção de água (SCHUCK et al., 2012; SKREBSKY; NICOLOSO; MALDANER, 2006). Além disso, o substrato solo utilizado foi peneirado, o que levou a quebra dos seus agregados, diminuindo seus macroporos. Resultados semelhantes durante esta fase foram relatados para mudas de jenipapeiro (*Genipa americana* L.), onde a maior porcentagem de sobrevivência foi obtida em substrato orgânico (50 %) (ROCHA et al., 2008). Entretanto, para plantas de mirtilheiro, a mistura de substratos vermiculita expandida de granulometria média + serragem curtida de *Pinus* e Plantmax + vermiculita expandida de granulometria média foram os mais adequados para maior enraizamento *ex vitro* (PELIZZA et al., 2012).

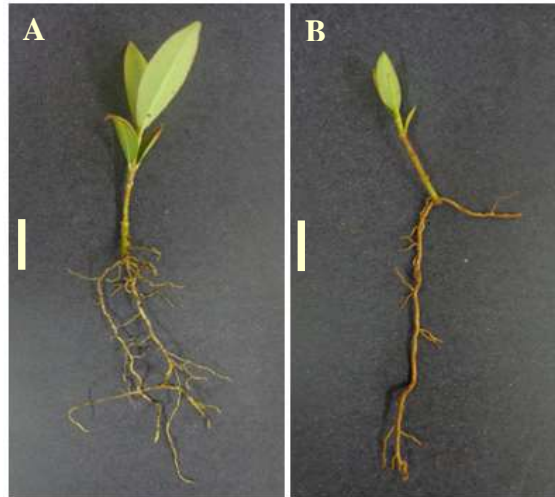
Entre ausência e presença de câmara úmida, a maior porcentagem de sobrevivência das mudas foi com a inoculação isolada de FMA e FPCV utilizando câmara úmida. O maior enraizamento, no entanto, foi proporcionado com a inoculação de FMA e no tratamento controle, com presença de câmara úmida (Tabela 8). Entre os tratamentos de inoculação, em ausência de câmara úmida ocorreu maior porcentagem de sobrevivência e enraizamento com a co-inoculação FMA + FPCV (Figura 7A e 7B). Entretanto, em presença de câmara úmida, a inoculação isolada do FMA proporcionou uma maior sobrevivência e enraizamento das mudas (Tabela 8).

**Tabela 8-** Porcentagem de sobrevivência e enraizamento de mudas micropropagadas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aclimatizadas em ausência ou presença câmara úmida e tratamentos de inoculação com fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Glomus clarum*, em casa de vegetação.

Inoculação	Câmara úmida			
	Ausência	Presença	Ausência	Presença
	Sobrevivência (%)		Enraizamento (%)	
FMA	10,0 Bb	35,0 Aa	33,3 Bb	100,0 Aa
FPCV	10,0 Bb	23,6 Ba	50,0 Ba	52,4 Ba
FMA + FPCV	20,0 Aa	27,5 Ba	62,5 Aa	66,7 Ba
Controle	5,0 Ba	10,0 Ca	16,7 Cb	33,3 Ca
Valor de F	3,41*		4,25*	
CV (%)	60,8		67,1	

Nota: Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, para casa variável, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott. \*Significativo a 5%. CV (%) = coeficiente de variação. Fonte: Elaboração do autor.

**Figura 7-** Plantas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aclimatizadas em ausência de câmara úmida, diferentes substratos e inoculação de fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e do fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Glomus clarum*, em casa de vegetação. Substratos Bioplant<sup>®</sup> + FMA + FPCV (A); Solo + Areia + Vermiculita + FMA + FPCV (B). Barra= 10 mm.



Fonte: Elaboração do autor.

Corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho, a inoculação de FMA, além de assegurar uma rápida formação e melhor desenvolvimento do sistema radicular em mudas micropropagadas de macieira, mostrou-se benéfica na formação do sistema radicular, proporcionou maior crescimento e produção de mudas com potencial para estabelecimento em viveiro ou campo (AKAR-KAÇAR et al., 2010; ZEMKE et al., 2003). A inoculação do FMA *Gigaspora margarita* durante a fase de aclimatização proporcionou maior crescimento de mudas de bananeira (LINS; TRINDADE; ROCHA, 2003; TRINDADE; LINS; MAIA, 2003).

*Glomus mosseae* aumentou a taxa de sobrevivência de mudas aclimatizadas de jambú (*Spilanthus acmella*), gerando maior crescimento da parte aérea, número de brotações, folhas por planta e maior área foliar. Mudas micropropagadas de citrus inoculadas com esse fungo exibiram maior taxa fotossintética, transpiração e condutância estomática (WU; ZOU; WANG, 2011; YADAV; SINGH; AGGARWAL, 2012).

A inoculação de outros microrganismos promotores de crescimento vegetal durante a aclimatização de mudas micropropagadas também é benéfica, como pode ser observado com a inoculação de *Azospirillum brasilense*, *Bacillus megaterium* e *Klebsiella pneumoniae* em mudas de tamareira (*Phoenix dactylifera*), que proporciona aumento no crescimento e sobrevivência das mudas (FARRAG; ABEER; DARWESH, 2011).

Durante a aclimatização de três frutíferas (ameixa Mr.S 2/5 (*Prunus cerasifera* x *P. spinosa*), híbrido GF 677 (*Prunus persica* x *P. amygdalus*) e maçã MM 106 (NorthenSpy x M1), a inoculação de *A. brasilense* Sp245 promoveu maior crescimento das mudas (VETTORI et al., 2010). A inoculação de plantas de gengibre vermelho (*Alpinia purpurata*) durante a aclimatização com *Azospirillum* sp. e *Azotobacter* sp. aumentou a taxa de sobrevivência, o diâmetro de caule, a massa seca de raiz e o número de brotações das plantas (OVANDO-MEDINA et al., 2007).

A co-inoculação FMA + FPCV, no presente trabalho, foi benéfica na ausência de câmara úmida, em ambiente com baixa umidade, demonstrando que a co-inoculação auxilia na adaptação de mudas de mangabeira a estresses ambientais (Figura 7A e 7B). Com isso, a inoculação do FMA em conjunto com outros microrganismos pode assegurar o estabelecimento da micorriza e aumentar os benefícios desta associação (LOCATELLI; VITOVSKI; LOVATO, 2002). Como observado por Oliveira et al. (2010), a inoculação de *Bacillus pumilus* associada com *Glomus etunicatum* + *G. margarita* estimulou a colonização micorrízica de gengibre-magnífico (*Zinger spectabile*). Mudas micropropagadas de banana inoculadas com *Glomus manihotis* + *Bacillus* spp. apresentaram maior massa fresca e seca de parte aérea e comprimento médio de parte aérea, área foliar (RODRÍGUEZ-ROMERO; GUERRA; JAIZME-VEJA, 2005).

Para comprimento médio de parte aérea, número médio de folhas, gemas, comprimento médio da maior raiz, massa fresca de parte aérea e raízes houve influência da ausência e presença de câmara úmida e substratos. Plantas de mangabeira aclimatizadas na presença de câmara úmida tiveram maior comprimento médio de parte aérea, número médio de folhas, gemas, comprimento médio da maior raiz, massa fresca de parte aérea e raízes (Tabela 9).

Tal resultado pode ser explicado, devido à perda de água de plantas produzidas *in vitro* ser um dos principais fatores negativos envolvidos na aclimatização, sendo necessário manter a umidade alta e a temperatura amena no início do processo de aclimatização, com o uso da câmara úmida. Esta mantém a umidade relativa do ar alta diminuindo a taxa de transpiração das folhas, pois umidades inferiores a 50% podem resultar em altos níveis de transpiração, causando estresse hídrico às plantas (ROCHA et al., 2008; SCARANARI; LEAL; PELLEGRINO, 2008)

Quanto ao tipo de substrato, os maiores valores médios para comprimento médio de parte aérea, número médio de folhas e gemas foram obtidos no Bioplant<sup>®</sup> e solo + areia + vermiculita, não ocorrendo benefício do substrato solo para o crescimento das plantas micropropagadas de mangabeira. Para comprimento médio da maior raiz, massa fresca de parte aérea e raízes, o substrato Bioplant<sup>®</sup> proporcionou os maiores valores médio (Tabela 10).

**Tabela 9-** Comprimento médio de parte aérea, número médio de folhas, gemas, comprimento médio da maior raiz, peso da massa fresca da parte aérea e raízes de mudas micropropagadas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aclimatizadas em presença ou ausência de câmara úmida, em casa de vegetação.

Câmara úmida	Comprimento médio de parte aérea (cm)	Número médio de folhas	Número médio de gemas
Ausência	2,01 B	1,81 B	4,11 B
Presença	3,55 A	3,83 A	7,26 A
Valor de F	9,20*	10,01*	9,73*
CV (%)	66,65	82,26	64,44
	Comprimento médio da maior raiz (cm)	Peso da massa fresca da parte aérea (g)	Peso da massa fresca das raízes (g)
Ausência	2,56 B	0,03 B	0,01 B
Presença	4,85 A	0,08 A	0,07 A
Valor de F	5,53*	9,27*	4,79*
CV (%)	95,5	103,8	143,3

Nota: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, para casa variável, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott. \*Significativo a 5%. CV (%)= coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração do autor.

**Tabela 10-** Comprimento médio de parte aérea, número médio de folhas, gemas, comprimento médio da maior raiz, peso da massa fresca da parte aérea e raízes de mudas micropropagadas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), aclimatizadas em substratos.

Substratos	Comprimento médio de parte aérea (cm)	Número médio de folhas	Número médio de gemas
Solo	1,26 B	1,25 B	2,50 B
Bioplant®	3,97 A	3,87 A	7,27 A
Solo + areia + verm	2,89 A	3,17 A	6,94 A
Valor de F	9,40*	5,74*	8,77*
C.V (%)	66,65	82,26	64,44
	Comprimento médio da maior raiz (cm)	Peso da massa fresca da parte aérea (g)	Peso da massa fresca das raízes (g)
Solo	1,59 B	0,02 B	0,01 B
Bioplant®	5,50 A	0,09 A	0,09 A
Solo + areia + verm	3,72 B	0,05 B	0,02 B
Valor de F	5,29*	4,76*	3,42*
CV (%)	95,45	103,78	143,26

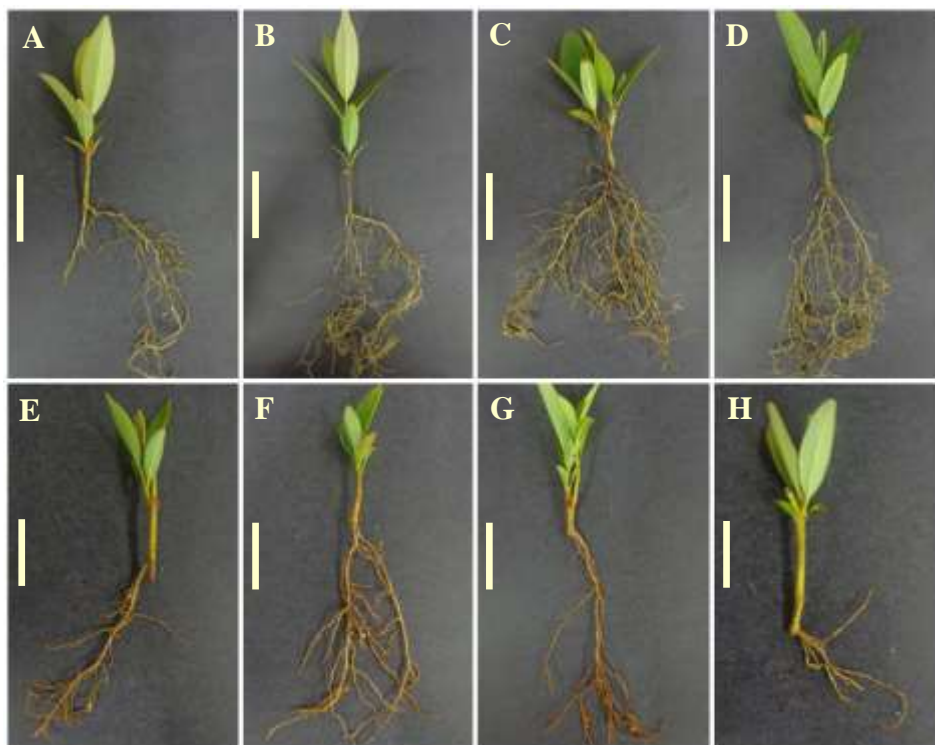
Nota: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, para casa variável, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott. Verm= vermiculita. \*Significativo a 5%. CV (%)= coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração do autor.

As plantas de mangabeira aclimatizadas em presença de câmara úmida, utilizando o substrato Bioplant®, mostraram formação de raízes adventícias e folhas expandidas (Figura

8A). Em Bioplant<sup>®</sup> com inoculação do FMA, as plantas exibiram maior formação de raízes adventícias e folhas expandidas, quando comparadas com a aclimatização nesse substrato sem a inoculação (Figura 8B). No Bioplant<sup>®</sup> as plantas inoculadas com FPCV mostraram o menor comprimento de parte aérea, com formação de folhas expandidas, porém maior formação de raízes adventícias e volume destas (Figura 8C). No entanto, as plantas aclimatizadas em Bioplant<sup>®</sup>, inoculadas com FMA + FPCV, apresentaram as características descritas anteriormente, porém com menor formação e volume de raízes adventícias (Figura 8D).

**Figura 8-** Plantas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aclimatizadas em presença de câmara úmida, substratos e inoculadas com fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Glomus clarum*, em casa de vegetação. Substrato Bioplant<sup>®</sup> (A); Bioplant<sup>®</sup> + FMA (B); Bioplant<sup>®</sup> + FPCV (C); Bioplant<sup>®</sup> + FMA + FPCV (D); Solo + areia + vermiculita (E); Solo + areia + vermiculita + FMA (F); Solo + areia + vermiculita + FPCV (G) e Solo + areia + vermiculita + FMA + FPCV (H). Barra= 10 mm.



Fonte: Elaboração do autor.

Em solo + areia + vermiculita, as plantas obtidas eram menores, com folhas expandidas e número reduzido de raízes adventícias (Figura 8E). As plantas aclimatizadas em solo + areia + vermiculita + FMA continham folhas expandidas menores com pigmentação vermelha e formação de raízes (Figura 8F), enquanto em solo + areia + vermiculita + FPCV, as plantas

eram parecidas com as descritas anteriormente, porém o volume de raízes formadas era menor (Figura 8G). Em solo + areia + vermiculita + FMA + FPCV, as plantas tinham menor comprimento médio de parte aérea, número reduzido de folhas expandidas e volume de raízes adventícias (Figura 8H).

As mudas micropropagadas de mangabeira foram beneficiadas com a utilização do substrato Bioplant<sup>®</sup> e câmara úmida durante a fase de aclimatização, apresentando maior porcentagem de sobrevivência, enraizamento e crescimento das plantas. A inoculação de FMA também favoreceu a porcentagem de sobrevivência e enraizamento das mudas, sendo que em condições de teor de umidade baixo, sem câmara úmida, a co-inoculação FMA + FPCV favoreceu a adaptação das plantas de mangabeira a condições adversas.

#### **4 CONCLUSÕES**

A aclimatização de plantas micropropagadas de mangabeira é favorecida com a utilização do substrato Bioplant<sup>®</sup> e câmara úmida. O substrato solo proporciona maior benefício às plantas durante a aclimatização em condições de baixo teor de umidade relativa, ou seja, ausência de câmara úmida.

A utilização de câmara úmida, os substratos Bioplant<sup>®</sup> e solo + areia + vermiculita e a inoculação isolada de FMA proporciona maior benefício para aclimatização de plantas micropropagadas de mangabeira. A co-inoculação de FMA + FPCV se destaca na ausência de câmara úmida, ou seja, em condição de umidade relativa menor.

## REFERÊNCIAS

- AKAR-KAÇAR, Y.; AKPINAR, C.; AGAR, A.; YALÇIN-MENDI, Y.; SERÇE, S.; ORTAS, I. The effect of mycorrhiza in nutrient uptake and biomass of cherry rootstocks during acclimatization. **Romain Biotechnological Letters**, Bucharest, v. 15, n. 3, p. 5247-5252, 2010.
- ANJOS, J. R. N.; CHARCHAR, M. J. D.; LEITE, R. G.; SILVA, M. S. Levantamento e patogenicidade de fungos associados às sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) no cerrado do Brasil central. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 3, p. 911-915, 2009.
- ANZANELLO, R.; SOUZA, P.; CASAMALI, B. (2011). Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em porta-enxertos micropropagados de videira. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 2, p. 409-415, 2011.
- BARROS, D. I.; BRUNO, R. de L. A.; NUNES, H. V.; MENDONÇA, R. M. N.; PEREIRA, W. E. Comportamento fisiológico de sementes de mangaba submetidas à dessecação. **Acta Tecnológica**, São Luiz, v. 5, n.1, p. 31-43, 2010.
- BRAGA, F. T.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; RAFAEL, G. C.; FAVERO, A. C.; VALENTE, T. C. T. Alterações morfofisiológicas de plantas de abacaxizeiro influenciadas por diferentes substratos durante o processo de aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 5, p. 863-868, 2011.
- CALDAS, L. S.; MACHADO, L. de L.; CALDAS, S. C.; CAMPOS, M. L.; CALDAS, J. A.; PHARIS, R. P.; PEREIRA-NETTO, A. B. Growth-active gibberellins overcome the very slow shoot growth of *Hancornia speciosa*, an important fruit tree from the Brazilian “Cerrado”. **Trees**, Vancouver, v. 23, n. 6, p. 1229-1235, 2009.
- COUTO, M.; WAGNER JÚNIOR, A.; QUEZADA, A. C. Efeito de diferentes substratos durante a aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto mirabolano 29C (*Prunus cerasifera* Ehrh.) em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 2, p. 125-128, 2003.
- ENDRINGER, D. C.; PEZZUTO, J. M.; BRAGA, F. C. Nf-kappab inhibitory activity of cyclitols isolated from *Hancornia speciosa*. **Phytomedicine**, Jena, v. 16, n. 11, p. 1064-1069, 2009.
- FARRAG, H. M.; ABEER, H. E.; DARWESH, R. S. Growth promotion of date palm plantlets *ex vitro* by inoculation of rhizosphere bacteria. **Journal of Horticultural Science and Ornamental Plants**, Dubai, v. 3, n. 2, p. 130-136, 2011.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FERREIRA, H. C.; SERRA, C. P.; ENDRINGER, D. C.; LEMOS, V. S.; BRAGA, F. C.; CORTES, S. F. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. **Phytomedicine**, Jena, v. 14, n. 7-8, p. 473-478, 2007.

FREY-KLETT, P.; GARBAYE, J.; TARKKA, M. The mycorrhiza helper bacteria revisited. **New Phytologist**, Malden, v. 176, n. 1, p. 22-36, 2007.

LÉDO, A. da S.; SECA, G. S. V.; BARBOZA, S. B. S. C.; SILVA JUNIOR, J. F. da. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 989-993, 2007.

LIMA, C. S. M.; BANDEIRA, J. M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M. V.; FIGUEIREDO, P. M.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Substratos para aclimatização de plantas micropropagadas de *Mentha viridis* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. S 2, p. 672-674, 2007.

LINS, G. D. L.; TRINDADE, A. V.; ROCHA, H. S. Utilização de gigaspora margarita em plantas micropropagadas de bananeira em diferentes estádios de enraizamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 143-147, 2003.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Carlisle, v. 30, p. 421-327, 1980.

LOCATELLI, L. M.; VITOVSKI, C. A.; LOVATO, P. E. Sistema radicular de porta-enxertos micropropagados de macieira colonizados com fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 9, p. 1239-1245, 2002.

LOPES, J. L. W.; GUERRINI, I. A.; SAAD, J. C. C.; SILVA, M. D. Atributos químicos e físicos de dois substratos para produção de mudas de eucalipto. **Cerne**, Viçosa, MG, v. 14, n. 4, p. 358-367, 2008.

MACHADO, L. L.; RAMOS, M. L. G.; CALDAS, L. S.; VIVALDI, L. J. Seleção de matrizes e clones de mangabeira para o cultivo *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, MG, v. 39, n. 5, p. 431-435, 2004.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, E. M.; ZARPELON, T. G.; SIQUEIRA, L. D. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, Santa Maria, v. 29, n. 6, p. 843-851, 2005.

MARINHO, D. G.; ALVIANO, D. S.; MATHEUS, M. E.; ALVIANO, C. S.; FERNANDES, P. D. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 135, n. 2, p. 530-537, 2011.

MOREIRA, M. A.; CARVALHO, J. G.; PASQUAL, M.; FRÁGUAS, C. B.; SILVA, A. B. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n 5, p. 875-879, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 15, p 473-479, 1962.

OLIVEIRA, J. P. de; COSTA, F. H. da S.; PEREIRA, J. E. S. Crescimento de mudas micropropagadas de bananeira aclimatizadas nas condições da Amazônia Sul Ocidental sob a influência de diferentes substratos e recipientes. **Revista Brasileira de Fruticultura**,

Jaboticabal, v. 30, n. 2, p.459-465, 2008.

OLIVEIRA, J. R. G. de; MORAES, M. T. A. de L.; MELO, N. F. de; MELO, A. M. Y. Fungos micorrízicos arbusculares e rizobactérias promotoras de crescimento na aclimatização de *Zingiber spectabile*. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 3, p. 687-694, 2010.

OVANDO-MEDINA, I.; ADRIANO-ANAYA, L.; CHAVEZ-AGUILAR, A.; OLIVALLAVEN, A.; AYORA-TALAVERA, T.; DENDOOVEN, L.; GUTIÉRREZ-MICELI, F.; SALVADOR-FIGUEROA, M. *Ex vitro* survival and early growth of *Alpinia purpurata* plantlets inoculated with *Azotobacter* and *Azospirillum*. **Pakistan Journal Biological Sciences**, Dubai, v. 10, n. 19, p. 3454-3457, 2007.

PELIZZA, T. R.; NASCIMENTO, D. C.; AFFONSO, L. B.; CAMARGO, S. S.; CARRA, B.; SCHUCH, M. W. Enraizamento de plântulas de mirtilheiro em condição *ex vitro* em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 1, p. 255-261, 2012.

PEREIRA, M. C. T.; NIETSCHE, S.; FRANÇA, A. C.; NUNES, C. F.; LIMA, C.; GONÇALVES, V. D.; SALLES, B. P.; MORAIS, D. L. B.; KOBAYASHI, M. K. Aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira sob diferentes condições de luminosidade. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 238-240, 2005.

ROCHA, E. L. J.; CARVALHO, A. C. P. P.; AZEVEDO, B. M.; MARINHO, A. B.; VIANA, T. V. A.; VASCONCELOS, D. V. Aclimatização de mudas micropropagadas de helicônia em ambiente protegido em função do tipo de substrato. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 6, p. 1457-1462, 2009.

ROCHA, M. A. C.; COSTA, M. A. P. C.; SILVA, S. A.; LEDO, C. A. S.; MOREIRA, M. J. S.; BASTOS, L. P. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 769-774, 2008.

RODRÍGUEZ-ROMERO, A. S.; GUERRA, M. S.; JAIZME-VEJA, M. C. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobacteria on banana growth and nutrition. **Agronomy for Sustainable Development**, Les Ulis Cedex A, v. 25, n. 3, p. 395-399, 2005.

SAMPAIO, D. B.; FILHO, P. F. M.; MASCENA, A. M.; FREIRE, V. F. Colonização micorrízica arbuscular e tolerância ao mal-do-panamá em mudas de banana-maçã. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 3, p. 462-469, 2012.

SAMPAIO, T. S.; L. NOGUEIRA, P. C. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, Oxford, v. 95, n. 4, p. 606-610, 2006.

SANTOS, A. F.; SILVA, S. M.; MENDONÇA, R. M. N.; ALVES, R. E. Conservação pós-colheita de mangaba em função da maturação, atmosfera e temperatura de armazenamento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 85-91, 2009.

SANTOS, P. C. G. dos; ALVES, E. U.; GUEDES, R. S.; SILVA, K. B.; CARDOSO, E. de A.; LIMA, C. R. de. Qualidade de sementes de *Hancornia speciosa* Gomes em função do

tempo de secagem. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 343-352, 2010.

SANTOS, M. R.; TIMBÓ, A. L.; CARVALHO, A.; MORAIS, J. P. Estudo de adubos e substratos orgânicos no desenvolvimento de mudas micropropagadas de helicônia.

**Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 273-278, 2006.

SCARANARI, C.; LEAL, P. A. M.; PELLEGRINO, G. Q. Estudo de simulações de microclimas em casas de vegetação visando à aclimação de mudas micropropagadas de bananeira cv Grande Naine. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 4, p. 1001-1008, 2008.

SCHUCK, M. R.; LIPSKI, B.; SILVA, A. L. L.; CARVALHO, D. C.; BIASI, L. A. Aclimação de plantas micropropagadas de videira cv. Bordô (*Vitis labrusca* L.) em diferentes substratos. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 3, n. 4, p. 2016-212, 2012.

SILVA, J. V.; HERNANDEZ, F. F. F.; BEZERRA, F. C.; DINIZ, J. D. N. Aclimação “ex vitro” de mudas de antúrio em diferentes substratos. **Revista Ciência Agrônômica**, Recife, v. 38, n. 2, p. 188-191, 2007.

SILVA, M. A. D.; SILVA, F. S. B. D.; YANO-MELO, A. M.; MELO, N. F. D.; MAIA, L. C. Fungos micorrízicos arbusculares e vermicomposto na aclimação de *Alpinia purpurata* (Viell.) Schum e *Zingiber spectabile* Griff. (Zingiberaceae). **Acta Botânica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 20, p. 249-256, 2006.

SILVA, R. L. O.; LUZ, J. S.; LUZ, J. S.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: Isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 20, n. 3, p. 649-655, 2006.

SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, E. C. S. F. T.; MALDANER, J. Substratos na aclimação de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida *in vitro* sob diferentes doses de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 5, p. 1416-1423, 2006.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A. D.; NOGUEIRA, R. C.; EMRICH, E. B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, 2007.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; STEIN, V. C.; NERY, F. C.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA<sub>3</sub> e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1847-1852, 2009.

SUGUINO, E., MARTINS, A. N.; MINAMI, K.; NARITA, N., PERDONÁ, M. J. Efeito da porosidade do substrato casca de *pinus* no desenvolvimento de mudas de grumixameira.

**Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, Volume Especial, p. 643-648, 2011.

TRINDADE, A. V.; LINS, G. D. L.; MAIA, I. C. S. Substratos e fungo micorrízico arbuscular em mudas micropropagadas de bananeira na fase de aclimação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 137-142, 2003.

VETTORI, L.; RUSSO, A.; FELICI, C.; FIASCHI, G.; MORINI, S.; TOFFANIN, A. Improving micropropagation: Effect of *Azospirillum brasilense* sp245 on acclimatization of rootstocks of fruit tree. **Journal of Plant Interactions**, London, v. 5, n. 4, p. 249-259, 2010.

WU, Q. S.; ZOU, Y. N.; WANG, G. Y. Arbuscular mycorrhizal fungi and acclimatization of micropropagated citrus. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Philadelphia, v. 42, n. 15, p. 1825-1832, 2011.

YADAV, K.; SINGH, N.; AGGARWAL, A. Arbuscular mycorrhizal technology for the growth enhancement of micropropagated *Spilanthes acmella* Murr. **Plant Protection Science**, Praga, v. 48, n. 1, p. 31-36, 2012.

ZEMKE, J. M.; PEREIRA, F.; LOVATO, P. E.; SILVA, A. D. Avaliação de substratos para inoculação micorrízica e aclimação de dois porta-enxertos de videira micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, n. 11, p. 1309-1315, 2003.

ZHAO, L.; ZHANG, Y. Q. Effects of phosphate solubilization and phytohormone production of trichoderma asperellum q1 on promoting cucumber growth under salt stress. **Journal of Integrative Agriculture**, Beijing, v. 14, n. 8, p. 1588-1597, 2015.

### CAPÍTULO 3

## SUBSTRATOS, CÂMARA ÚMIDA E FUNGOS PROMOTORES DO CRESCIMENTO VEGETAL NA ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE MANGABEIRA

**RESUMO:** A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) se destaca entre as árvores frutíferas nativas do cerrado como uma das mais promissoras para exploração sustentável. A aclimatização é a etapa final da micropropagação, porém é uma fase crítica devido a dificuldade de readaptação das plantas ao ambiente *ex vitro*. A inoculação de fungos promotores do crescimento na fase de aclimatização favorece a formação mais precoce da muda, maior crescimento das plantas, aumento da uniformidade do material obtido e maior desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea. Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de diferentes substratos, tipos de câmara úmida (copo e saco plástico) e inoculação *ex vitro* de fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) em mistura e do fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Glomus clarum* na aclimatização de plantas micropropagadas de mangabeira. Para ambos os ensaios, as plantas micropropagadas foram provenientes do terceiro subcultivo de segmentos nodais, obtidos de sementes preestabelecidas *in vitro*. No ensaio (I), estas foram aclimatizadas em cinco substratos (Bioplant<sup>®</sup>, solo, areia, areia + solo (1:1) e areia + solo + vermiculita (1:1:1)), com dois tipos de câmara úmida: copo plástico e saco plástico, em vasos. Enquanto que no ensaio (II), foram aclimatizadas no substrato Bioplant<sup>®</sup> que recebeu quatro tratamentos de inoculação: FMA, FPCV, FMA + FPCV e controle não inoculado. O substrato Bioplant<sup>®</sup> e o saco plástico como câmara úmida são os mais adequados para a aclimatização de plantas de mangabeira por possibilitar maior porcentagem de sobrevivência de plantas, peso da massa seca das folhas, caule, raiz e relação peso da massa seca das raízes/peso da massa seca da parte aérea. A inoculação de FPCV proporcionou a maior porcentagem de sobrevivência das plantas durante a aclimatização, enquanto a co-inoculação FMA + FPCV promoveu maior crescimento das plantas aclimatizadas de mangabeira.

**Palavras-chave:** Frutíferas do cerrado. Produção de mudas. *Hancornia speciosa* Gomes. Micorriza arbuscular. Fitormônio.

## 1 INTRODUÇÃO

A necessidade de um grande número de mudas de alta qualidade e baixo valor de produção, para instalação de pomares, requer o uso de métodos intensivos de propagação. A micropropagação utilizando técnicas de cultura de tecidos é a alternativa mais empregada com a finalidade de obter um grande número de plantas uniformes, independente da época do ano. Ela é importante na propagação de diferentes espécies que, assim como a mangabeira, apresentam baixa taxa de germinação (LÉDO et al., 2007; SOARES et al., 2007a).

Plantas micropropagadas, porém, quando aclimatizadas, sofrem com a adaptação ao ambiente *ex vitro*, sendo as perdas de plantas devido a transferência das condições *in vitro* para casa de vegetação. Como nesta etapa necessitam ativar a fotossíntese e a absorção de água e nutrientes, ficam mais suscetíveis ao déficit hídrico (OLIVEIRA et al., 2010). Assim, o sucesso da etapa de aclimatização depende da eficiência do enraizamento.

Como alternativa para estimular o enraizamento durante a etapa de aclimatização pode ser utilizado microrganismos promotores do crescimento vegetal, como por exemplo, solubilizadores de fosfato, ou os relacionados à produção de fitormônios, como auxinas, giberelinas, citocininas, ácidos lácticos e succínicos (GRAVEL; ANTOUN; TWEDDELL, 2007; MAFIA et al., 2005; SILVA et al., 2006; RADWAN; MOHAMED; REIS, 2004).

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), por meio da associação simbiótica, são amplamente reconhecidos pelos diversos efeitos positivos proporcionados às plantas. Eles auxiliam no crescimento em decorrência do aumento da área de solo explorada pelas raízes, promovendo maior absorção de nutrientes por parte da planta (LIMA et al., 2006), especialmente do fósforo (P), aumentando a tolerância a estresses bióticos e abióticos. O uso destes microrganismos em mudas de espécies arbóreas em viveiro, pode beneficiar o desenvolvimento, maximizando sua capacidade de estabelecimento em campo (ANZANELLO; SOUZA; CASAMALI, 2011; MATOS; SILVA; BRASIL, 2002).

Durante a aclimatização, o substrato adequado reduz a mortalidade das plantas, mas a resposta das plantas pode ser influenciada mediante suas características (MOREIRA et al., 2006; PEREIRA et al., 2005; SILVA et al., 2007). Suas propriedades físicas, químicas e biológicas podem facilitar ou limitar a sobrevivência, formação de novas raízes e o consequente crescimento das plantas (OLIVEIRA; COSTA; PEREIRA, 2008). Desta forma, podem contribuir significativamente para que as mudas micropropagadas cheguem ao setor produtivo de forma mais rápida e barata.

Entre as árvores frutíferas nativas do cerrado, a mangabeira (*Hancornia speciosa*

Gomes) se destaca como uma das mais promissoras para os programas de exploração sustentável. A incorporação da mangabeira em sistemas de horticultura tem sido proposta como um meio para contribuir para a sua conservação e, também, reduzir a pobreza em áreas em que esta frutífera é nativa e cresce satisfatoriamente. Apesar de ter grande potencial para exploração econômica, a falta de informações sobre esta cultura vem restringindo seu cultivo comercial, tornando o seu aproveitamento limitado a pequenos produtores e a exploração extrativista (COSTA et al., 2005; SANTOS et al., 2010; SOARES et al., 2007a; 2009).

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de diferentes substratos, tipos de câmara úmida (copo e saco plástico) e inoculação *ex vitro* de fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) em mistura e do FMA *Glomus clarum* na aclimatização de plantas micropropagadas de mangabeira.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal utilizado foi retirado de frutos de diferentes plantas de mangabeira coletados na Fazenda Gameleira, município de Montes Claros de Goiás-GO. Após a despolpa manual, as sementes foram desinfestadas superficialmente, permanecendo 1 min em álcool 70 % (v/v) e 30 min em solução de cloro ativo (1 %). O triplo enxágue foi realizado em câmara de fluxo laminar com água destilada e autoclavada, e elas foram transferidas, uma a uma, para tubo de ensaio (25 x 150 mm) contendo 20 mL de meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) modificado para a metade da concentração original dos sais (MS ½), mais vitaminas, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 3,5 g L<sup>-1</sup> de ágar (Dinâmica®).

O pH foi ajustado para  $5,7 \pm 0,03$  antes da autoclavagem. Após inoculação, as sementes foram mantidas sob fotoperíodo de 16 h, temperatura de  $23 \pm 3$  °C, umidade relativa de 45 a 46 % e radiação fotossintética ativa de 45 - 55  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , permanecendo para fornecer explantes preestabelecidos *in vitro*.

### 2.2 PRÉ-ACLIAMATIZAÇÃO DE PLANTAS DE MANGABEIRA

Para a pré-aclimatização as plantas foram transferidas para frascos (12 x 5 cm) contendo 25 mL de meio de cultivo WPM (LLOYD; MCCOW, 1980), modificado para a metade da concentração original dos sais (WPM ½), mais vitaminas, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 3,5 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado para  $5,7 \pm 0,03$  antes da autoclavagem. Em cada frasco foi adicionado cinco plantas, as quais foram mantidas em sala de crescimento, com descrito no item 2.1.

Após 20 dias, os frascos foram transferidos para armário com radiação fotossintética ativa de 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16 h, com temperatura de  $27 \pm 3$  °C e umidade relativa de 48 a 50 % (Figura 1A). As tampas de polipropileno dos frascos foram inicialmente destravadas, posteriormente deixadas semiabertas e, em seguida, retiradas, tendo 24 h entre cada etapa deste procedimento (Figuras 1B a 1E).

As plantas após esse período foram removidas do meio de cultivo (Figura 2A e 2B), colocadas em bandeja contendo água destilada e as raízes existentes retiradas.

**Figura 1-** Pré-aclimatização de plantas micropropagadas de mangabeira. Frascos com plantas de mangabeira no armário (A), com as tampas destravadas (B), com tampas semi-abertas (C), tampa dos frascos retirada (D) e frascos sem as tampas de polipropileno (E).



Fonte: Elaboração do autor.

### **Ensaio I – Aclimatização de plantas de mangabeira em substratos e câmara úmida**

As plantas foram transplantadas para vasos plásticos (10,2 x 7,8 x 7,8 cm; 415 mL) contendo os seguintes substratos: Bioplant<sup>®</sup>, solo, areia, areia + solo (1:1), areia + solo + vermiculita (1:1:1), com características químicas, físicas e químicas descritas nas Tabelas 1, 2 e 3, e submetidas a dois tipos de câmara úmida: copo plástico transparente de 300 mL colocados sobre as plantas e saco plástico de 1 L envolvendo o vaso (Figura 2C e 2D).

Ao final de 120 dias foi avaliado porcentagem de sobrevivência, comprimento médio da parte aérea, maior raiz, entrenós, número médio de folhas, gemas, entrenós, diâmetro médio de caule, volume de raiz, peso da massa fresca e seca das folhas, caule, raiz, parte aérea, total e peso da massa seca das raízes/ peso da massa seca da parte aérea (PMSR/PMSP), área foliar e razão da área foliar.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 2 x 5 (tipo de câmara úmida x tipos de substratos), com 20 repetições cada tratamento, cada uma constituída por um vaso com uma planta. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente,

mediante a análise de variância, testando as médias pelo teste Tukey (5%), utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2011).

**Tabela 1-** Características químicas dos substratos utilizados na aclimatização de plantas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), em presença ou ausência de câmara úmida, em casa de vegetação.

Substratos	MO	P <sub>(resina)</sub>	pH	K	Ca	Mg	H+Al	SB	CTC	V
	g dm <sup>-3</sup>	mg dm <sup>-3</sup>		.....mmolc dm <sup>-3</sup> .....						%
Areia (A)	7,0	7,0	6,1	0,3	2,0	2,0	8,0	4,3	12,3	35,0
Solo (S)	40,0	24,0	6,2	3,9	76,0	28,0	22,0	107,9	129,9	83,0
A+S	21,0	19,0	6,2	2,4	50,0	20,0	15,0	72,4	87,4	83,0
A+S+Verm	16,0	16,0	6,6	1,8	30,0	56,0	12,0	87,8	99,8	88,0
Bioplant <sup>®</sup>	115,0	217,0	6,0	15,4	67,0	71,0	22,0	153,4	175,4	87,0

Fonte: Elaboração do autor.

**Tabela 2-** Características nutricionais do substrato Bioplant<sup>®</sup> utilizado na aclimatização de plantas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), em presença ou ausência de câmara úmida, em casa de vegetação.

Substrato	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	.....g kg <sup>-1</sup> .....						.....mg kg <sup>-1</sup> .....				
Bioplant <sup>®</sup>	5,5	4,5	2,0	8,6	5,4	8,3	22	20	18212	291	60

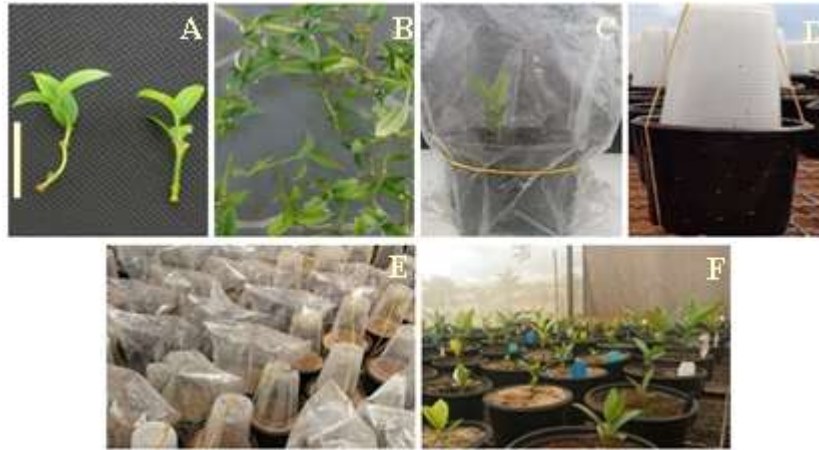
Fonte: Elaboração do autor.

**Tabela 3-** Características físicas dos substratos utilizados na aclimatização de plantas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), em presença ou ausência de câmara úmida, em casa de vegetação.

Substratos	Areia	Silte	Argila
	.....g kg <sup>-1</sup> .....		
Areia (A)	990	3	7
Solo (S)	489	163	348
Areia + Solo	780	56	164
Areia + Solo + Vermiculita	814	49	137

Fonte: Elaboração do autor.

**Figura 2-** Aclimatização de plantas de mangabeira em casa de vegetação. Plantas de mangabeira após terem sido retiradas dos frascos com meio de cultivo (A e B); vasos com saco plástico (C); vasos com copo plástico (D); Vasos com os copos e sacos plásticos (E); Plantas sem os copos e sacos plásticos aos 100 dias de implantação (F). Barra= 10 mm.



Fonte: Elaboração do autor.

### **Ensaio II – Inoculação de plantas de mangabeira na aclimatização com fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e do *Glomus clarum***

Foram utilizados quatro FPCV (MA2, MA5, MF1 e MF3), isolados de solo próximo a raízes de plantas de mangabeira, conforme descrito por Cabral (2012) e mantidos em tubos de ensaio contendo meio de cultura GL (glicose 10 g; extrato de levedura 2 g e ágar 15 g), em refrigerador a 5 °C. Para a inoculação, foi preparada uma mistura dos quatro FPCV, tendo sido cada isolado cultivado separadamente, em erlenmeyer de 125 mL contendo meio líquido GL (extrato de levedura e glicose) e incubados a 28 °C por 72 h. Os inoculantes foram padronizados para  $10^8$  ufc (unidade formadora de colônia)  $\text{mL}^{-1}$  utilizando câmara de Neubauer e misturados na relação 1:1 (v:v) no momento da inoculação das mudas.

O inoculante micorrízico foi constituído por *G. clarum*, procedente da coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo da UFLA – Universidade Federal de Lavras, e doada à UNESP- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia, Campus de Ilha Solteira.

As plantas de mangabeira foram aclimatizadas em substrato Bioplant<sup>®</sup> e submetidas a quatro tratamentos de inoculação: FMA, FPCV, FMA + FPCV e controle. Todos os vasos foram envoltos com saco plástico de 1 L. As plantas que receberam *G. clarum* foram inoculadas no orifício de transplantio com 3,3 g de inóculo ( $10^8$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  de solo). Para a inoculação dos FPCV foi adicionado 15 mL de inoculante líquido da mistura dos isolados a  $10^8$  ufc  $\text{mL}^{-1}$  no

colo de cada planta.

Ao final de 120 dias foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das plantas, comprimento médio da parte aérea e maior raiz, número médio de folhas, gemas, entrenós, diâmetro do caule, volume das raízes, peso da massa fresca e seca das folhas, caule, raízes, total das plantas e área foliar. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, contendo 4 tratamentos com 20 repetições cada, cada uma constituída por um vaso com uma planta.

Os dados foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando as médias pelo teste de Tukey (5%), utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2011).

Em ambos os ensaios, os vasos foram mantidos em casa de vegetação com temperatura de  $35 \pm 3$  °C, umidade relativa de 20 a 25 % e sombreamento de 50 %. A irrigação era manual, ocorrendo três dias na semana com volume de 15 mL por vaso. A cada duas semanas a irrigação era realizada com solução nutritiva, composta pelos sais do meio WPM  $\frac{1}{2}$  (Tabela 4), no volume de 15 mL por vaso.

**Tabela 4-** Sais do meio de cultivo WPM  $\frac{1}{2}$  utilizados para preparo da solução nutritiva.

Solução	Componentes	Concentração na solução estoque (p/ 1 litro)	Volume para 1 litro
A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ;	10,00 g L <sup>-1</sup>	20 mL
	Ca[NO <sub>3</sub> ].4H <sub>2</sub> O	13,90 g L <sup>-1</sup>	
B	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	24,75 g L <sup>-1</sup>	20 mL
C	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,40 g L <sup>-1</sup>	20 mL
D	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ;	17,00 g L <sup>-1</sup>	5 mL
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ;	0,65 g L <sup>-1</sup>	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25 g L <sup>-1</sup>	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O;	37,00 g L <sup>-1</sup>	
E	MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O;	2,23 g L <sup>-1</sup>	5 mL
	ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O;	0,86 g L <sup>-1</sup>	
	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,025 g L <sup>-1</sup>	
F	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,78 g L <sup>-1</sup>	5 mL
	Na <sub>2</sub> .EDTA	3,72 g L <sup>-1</sup>	

Fonte: Elaboração do autor.

Para os tratamentos que continham saco plástico, a cada sete dias foi realizado um furo neste, até chegar a sua abertura plena, totalizando 4 furos. Após 30 dias os copos, sacos plásticos e o sombreamento foram retirados e passou a ser utilizada irrigação automática todos os dias e solução nutritiva, a cada duas semanas, no volume de 15 mL.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Ensaio I – Aclimatização de plantas de mangabeira em substratos e câmara úmida

Para porcentagem de sobrevivência, comprimento médio da parte aérea, número médio de entrenós, relação peso da massa seca das raízes/ peso da massa seca da parte aérea, peso da massa seca das folhas, caule, raiz e total das plantas de mangabeira ocorreu efeito da interação tipos de substratos x câmara úmida (Tabelas 5 e 6).

**Tabela 5-** Porcentagem de sobrevivência, comprimento médio da parte aérea, número médio de entrenós e relação peso da massa seca das raízes/peso da massa seca da parte aérea (PMSR/PMSP) de plantas micropropagadas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aclimatizadas em substratos e câmara úmida, em casa de vegetação.

Substratos	Câmara úmida			
	Copo plástico	Saco plástico	Copo plástico	Saco plástico
	Sobrevivência (%)		Comprimento médio da parte aérea (cm)	
Solo	10,0 Cb	35,0 Ba	5,25 Aa	10,00 Ba
Areia	15,0 Ca	20,0 Ca	5,00 Aa	7,20 Ba
Bioplant®	100,0 Aa	90,0 Ab	6,83 Aa	6,56 Ba
Areia + solo	10,0 Ca	10,0 Ca	8,50 Aa	7,50 Ba
Areia + Solo + Verm	30,0 Bb	40,0 Ba	10,00 Ab	15,69 Aa
Valor de F	8,18*		2,71*	
CV (%)	15,39		42,36	
	Número de entrenós		PMSR/PMSP	
Solo	4,00 Bb	9,78 Aa	0,12 Bb	0,25 Aa
Areia	6,33 Aa	9,00 Aa	0,25 Aa	0,26 Aa
Bioplant®	7,27 Aa	7,30 Ba	0,25 Aa	0,25 Aa
Areia + solo	5,00 Ba	5,00 Ba	0,11 Ba	0,13 Ba
Areia + Solo + Verm	8,86 Aa	10,00 Aa	0,25 Aa	0,23 Aa
Valor de F	2,98*		3,67*	
CV (%)	26,43		17,68	

Nota: Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, para cada variável, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey. Verm= vermiculita. \*Significativo a 5%. CV (%)= coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração do autor.

Como as plantas de mangabeira passaram por fase de pré-aclimatização, esta pode ter proporcionado maior sobrevivência das plantas, juntamente com os outros fatores estudados. Resultado semelhante foi relatado para plantas de videira cv. Bordô (*Vitis labrusca* L.) e *Eucalyptus saligna* onde a fase de pré-aclimatização beneficiou a sobrevivência das plantas

(SCHUCK et al., 2012; SILVA et al., 2011).

A utilização de uma pré-aclimatização antes da remoção das plantas dos frascos, tem sido apontado por outros autores (NASCIMENTO et al., 2008; SCHUCK et al., 2012; SILVA et al., 2011; VILLA et al., 2006) como um método eficiente de rustificação de plantas micropropagadas, antes de estas serem levadas para ambiente *ex vitro*, proporcionando maior sobrevivência. Durante essa fase é proporcionado maior troca gasosas às plantas por meio da retirada da vedação utilizada, por períodos de tempo até a retirada total. Ainda, ocorrerá exposição a umidade relativa do ar mais baixa a que no interior dos frascos de cultivo e maior intensidade luminosa (MARTINS et al., 2011; MOURA et al., 2012).

**Tabela 6-** Peso da massa seca das folhas, caule, raiz e total de plantas micropropagadas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aclimatizadas em diferentes substratos e câmara úmida, em casa de vegetação.

Substratos	Câmara úmida			
	Copo plástico	Saco plástico	Copo plástico	Saco plástico
	Massa seca das folhas (g)		Massa seca do caule (g)	
Solo	0,85 Bb	1,80 Aa	0,68 Bb	1,42 Ba
Areia	1,35 Aa	1,58 Aa	1,30 Aa	1,34 Ba
Bioplant®	1,61 Aa	1,65 Aa	1,35 Aa	1,39 Ba
Areia + solo	1,00 Ba	1,06 Ba	0,69 Ba	0,73 Ca
Areia + Solo + Verm	1,78 Aa	1,52 Aa	1,41 Ab	2,05 Aa
Valor de F	2,64*		4,91*	
CV (%)	25,00		19,51	
	Massa seca das raízes (g)		Massa seca total (g)	
Solo	0,70 Bb	1,53 Aa	2,23 Bb	4,74 Aa
Areia	1,39 Aa	1,53 Aa	4,04 Aa	4,46 Aa
Bioplant®	1,46 Aa	1,52 Aa	4,42 Aa	4,56 Aa
Areia + solo	0,66 Ba	0,87 Ba	2,36 Ba	2,67 Ba
Areia + Solo + Verm	1,53 Aa	1,66 Aa	4,73 Aa	5,23 Aa
Valor de F	3,03*		2,85*	
CV (%)	18,38		18,76	

Nota: Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, para cada variável, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey. Ver= vermiculita. \*Significativo a 5%. CV (%)= coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração do autor.

Dentre os substratos testados, quando o copo plástico foi utilizado como câmara úmida, gerando a maior porcentagem de sobrevivência das plantas ocorreu no Bioplant® (Tabela 5). No entanto, para número médio de entrenós e relação PMSR/PMSP, os substratos areia,

Bioplant<sup>®</sup> e areia + solo + vermiculita proporcionaram as maiores médias. Não ocorreu influência dos substratos para comprimento médio da parte aérea.

Ao ser utilizado o saco plástico como câmara úmida, o substrato Bioplant<sup>®</sup> garantiu maior porcentagem de sobrevivência, enquanto o substrato areia + solo + vermiculita mostrou maior comprimento médio de parte aérea. Maior número de entrenós foi obtido utilizando os substratos solo, areia e areia + solo + vermiculita, enquanto a areia + solo exibiu menor valor médio para PMSR/PMSP (Tabela 5).

Entre os tipos de câmara úmida, maior porcentagem de sobrevivência de mudas foi verificada no substrato Bioplant<sup>®</sup> (100 %). Maior comprimento médio de parte aérea foi proporcionado utilizando saco plástico no substrato areia + solo + vermiculita, e o maior número médio de entrenós (9,78), enquanto maior relação PMSR/PMSP (0,25) ocorreu no substrato solo com saco plástico como câmara úmida (Tabela 5).

Para peso da massa seca das folhas, caule, raiz e total, entre os substratos utilizando copo plástico, areia, Bioplant<sup>®</sup> e areia + solo + vermiculita mostraram os maiores valores médios. Com o saco plástico como câmara úmida, o peso da massa seca das folhas, raiz e total foram maiores nos substratos solo, areia, Bioplant<sup>®</sup> e areia + solo + vermiculita, porém para peso da massa seca do caule o substrato areia + solo + vermiculita proporcionou maior valor médio. Com o saco plástico como câmara úmida foi verificado as maiores médias no substrato solo para peso da massa seca das folhas, raiz e total das plantas de mangabeira. Para peso da massa seca do caule, o substrato solo e areia + solo + vermiculita proporcionaram maiores valores médios (Tabela 6).

Para número de folhas, gemas, diâmetro de caule, comprimento médio da maior raiz, entrenós e razão da área foliar foram observados efeitos isolados dos tipos de substratos (Tabela 7). O substrato areia + solo + vermiculita proporcionou maior número médio de folhas, comprimento de entrenós, peso da massa fresca das folhas e total. Para número de gemas, diâmetro de caule, área foliar e razão da área foliar os substratos solo e areia + solo + vermiculita geraram maiores valores médios, porém o substrato areia + solo mostrou os menores valores médios para comprimento médio da maior raiz e peso da massa fresca de caule (Tabela 7).

Para peso da massa fresca das folhas, caule, total e área foliar ocorreu influência dos fatores substrato e câmara úmida isolados, enquanto que para peso fresco e volume de raízes houve efeito apenas para tipos de câmara úmida (Tabela 7 e 8).

**Tabela 7-** Peso da massa fresca das folhas, caule, total, comprimento médio de entrenós, área foliar e razão da área foliar de plantas micropropagadas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aclimatizadas em substratos, em casa de vegetação.

Substratos	Número de folhas	Número de gemas	Diâmetro de caule (mm)	Comprimento médio da maior raiz (cm)	Comprimento de entrenós (cm)
Solo	9,18 B	12,54 A	0,071 A	10,32 A	0,96 B
Areia	8,25 B	10,25 B	0,060 B	9,81 A	0,83 B
Bioplant®	7,32 B	10,07 B	0,060 B	11,85 A	0,96 B
Areia+solo	6,75 B	7,50 B	0,035 C	6,50 B	0,80 B
Areia+Solo+Verm	13,07 A	14,93 A	0,080 A	11,87 A	1,37 A
Valor de F	9,64*	7,31*	6,45*	2,39*	2,92*
CV (%)	38,59	32,01	32,34	34,30	47,27
Substratos	Massa fresca das folhas (g)	Massa fresca do caule (g)	Massa fresca total (g)	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Razão da área foliar (cm <sup>2</sup> mg <sup>-1</sup> )
Solo	2,57 B	1,51 A	5,94 B	6,29 A	1,32 A
Areia	2,03 B	1,47 A	5,41 B	2,92 B	0,69 B
Bioplant®	2,45 B	1,57 A	6,06 B	4,27 B	0,96 B
Areia+solo	1,89 B	0,91 B	4,22 B	4,78 B	0,94 B
Areia+Solo+Verm	2,54 A	1,82 A	7,64 A	8, 12 A	1,62 A
Valor de F	4,32*	6,17*	3,75*	8,10*	5,46*
CV (%)	38,46	21,04	29,62	48,00	48,80

Notas: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre substratos não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey. Verm= vermiculita. \*Significativo a 5%. CV (%) = coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração do autor.

**Tabela 8-** Peso da massa fresca das folhas, caule, raiz, total, volume de raiz e área foliar de plantas micropropagadas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) aclimatizadas em diferentes câmaras úmidas, em casa de vegetação.

Câmara úmida	Massa fresca das folhas (g)	Massa fresca do caule (g)	Massa fresca das raízes (g)
Copo plástico	2,31 B	1,48 B	1,83 B
Saco plástico	2,85 A	1,64 A	2,18 A
Valor de F	5,14*	4,33*	5,42*
C.V (%)	38,46	21,04	31,40
	Massa fresca total (g)	Volume de raiz (ml)	Área foliar (cm <sup>2</sup> )
Copo plástico	5,62 B	0,65 B	4,50 B
Saco plástico	6,67 A	1,00 A	5,74 A
Valor de F	5,85*	9,11*	4,52*
C.V (%)	29,62	58,11	48,00

Notas: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott. \*Significativo a 5%. C.V (%)= coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração do autor.

Independente da câmara úmida utilizada, as mudas de mangabeira mostraram maior porcentagem de sobrevivências no Bioplant<sup>®</sup>. Tal resultado pode ser explicado, pelo fato dos demais substratos não terem espaços suficientes para aeração, associado à elevada capacidade de retenção de água, características necessárias para a aclimatização de plantas micropropagadas. Com isso, os produtores utilizam uma mistura de substratos durante essa fase ou substrato comercial, devido sua uniformidade de composição química, física e capacidade de retenção de água (SCHUCK et al., 2012; SKREBSKY; NICOLOSO; MALDANER, 2006).

Quanto às características químicas e nutricionais dos substratos, observa-se que tanto o Bioplant<sup>®</sup> quanto o solo + areia + vermiculita encontram-se em equilíbrio, com níveis adequados de nutrientes (Tabelas 1 e 2). Além da alta porosidade dos substratos (Tabela 3), favorecer o enraizamento das mudas, proporcionando sistema radicular mais ramificado, parte aérea com emissão de novas folhas e expansão das existentes (LOPES et al., 2008). Substratos com boa aeração afetam o teor de água retido e o seu equilíbrio com a aeração, permitindo melhor crescimento do sistema radicular juntamente com uma adequada disponibilidade de nutrientes (SOBRINHO et al., 2010).

A utilização do substrato orgânico Bioplant<sup>®</sup> favoreceu o crescimento das plantas de mangabeira neste trabalho. Mesmo resultado foi obtido em mudas de abacaxizeiro cv. Pérola, com maior crescimento de parte aérea e raiz (MOREIRA et al., 2006). Para plantas de abacaxizeiro cv. Smooth Cayenne o substrato Plantmax<sup>®</sup> + húmus na aclimatização é o mais adequado (SILVA et al., 2012). Maior massa fresca e seca de raiz de abacaxizeiro (*Ananas comosus*) Imperial (CATUNDA et al., 2008). O maior acúmulo de matéria fresca e desenvolvimento de raiz de amoreira-preta (*Rubus* spp.) foi obtido durante a aclimatização (VILLA et al., 2006) com o Plantmax<sup>®</sup>.

A utilização de substrato orgânico foi recomendada na aclimatização de videira cv. Bordô (*Vitis labrusca*) (SCHUCK et al., 2012). O substrato Ecoterra<sup>®</sup> proporciona sistema radicular bem desenvolvido e maior parte aérea de plantas de jenipapeiro (*Genipa americana*) (ROCHA et al., 2008), enquanto o substrato orgânico Tecnomax<sup>®</sup> foi recomendado para aclimatização de plantas de amoreira-preta (PELIZZA et al., 2013).

A mistura de Plantmax + vermiculita é recomendada para a aclimatização de plantas de mirtilo (*Vaccinium* spp.) (PELIZZA et al., 2011), enquanto que para aclimatização de abacaxizeiro “Gomo de Mel”, a vermiculita isoladamente foi a mais adequado (BRAGA et al., 2011). Freire et al. (2011), trabalhando com plantas de mangaba oriundas da cultura de embrião, obtiveram maior crescimento da parte aérea, número de folhas e de nós nos substratos areia + pó da casca de coco seco (1:1) e vermiculita + areia (1:1).

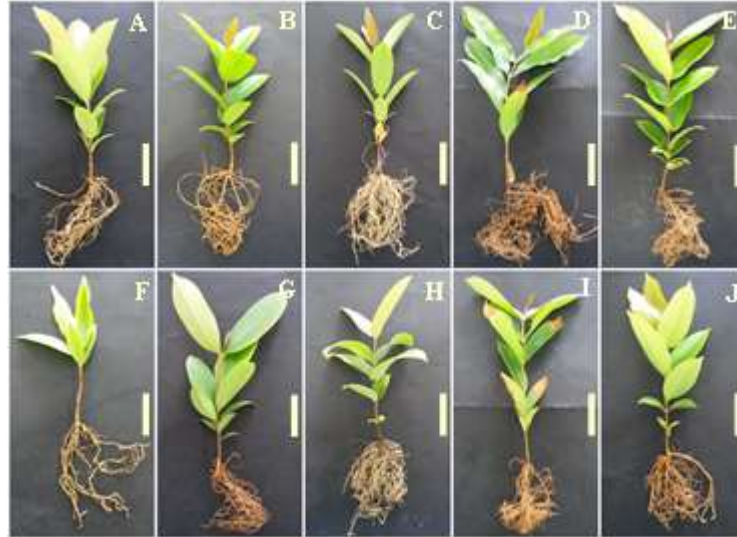
A utilização de saco plástico como câmara úmida proporcionou maior peso da massa fresca das folhas, caule, raiz, total das plantas, volume de raiz e área foliar das plantas de mangabeira (Tabela 8). A maior retenção de água pelo sistema utilizando saco plástico como câmara úmida proporcionou maior crescimento das plantas de mangabeira, enquanto que o uso de copo plástico acarretou em perdas de água, possivelmente devido o método que apenas cobrir a plantas deixando o substrato exposto, acarretando em menor crescimento destas (Tabelas 5, 6 e 8).

Tais resultados podem ser explicados devido à perda de água de plantas produzidas *in vitro* ser um dos principais fatores negativos envolvidos na aclimatização. É necessário manter a umidade alta e a temperatura amena no início do processo de aclimatização, com uso de câmara úmida. Ao manter a alta umidade relativa do ar, diminui a taxa de transpiração das folhas, evitando estresse hídrico às plantas (ROCHA et al., 2008; SCARANARI; LEAL; PELLEGRINO, 2008). No entanto, a necessidade de aclimatização utilizando cobertura plástica, como câmara úmida, não se adequada para todas as espécies. A aclimatização de plantas de mirtilheiro (*Vaccinium* spp.) não é recomendado a utilização de cobertura plástica como câmara úmida (PELIZZA et al., 2011).

As mudas de mangabeira, quando aclimatizadas utilizando saco plástico, visualmente exibiram maior crescimento, formação de raiz, folhas com coloração característica da planta de verde escuro, com tons avermelhado e expandidas com entrenós curtos (Figuras 3A, 3B, 3C, 3D e 3E). No substrato areia, as mudas tinham formação de folhas expandidas, porém com coloração verde clara, sem ocorrência a pigmentação avermelhada e com formação de raiz (Figura 3A). No substrato solo e Bioplant<sup>®</sup>, as mudas tinham folhas de coloração escura e expandidas e pigmentação avermelhada, com formação de raiz (Figuras 3B e 3C). Na mistura areia + solo e areia + solo + vermiculita, as mudas exibiram formação de folhas maiores e expandidas com coloração verde escura, entrenós curtos e formação de raiz (Figuras 3D e 3E).

Quando as mudas foram aclimatizadas utilizando copo plástico, houve menor crescimento, com formação de raízes e as folhas mostravam coloração verde clara (Figuras 3F, 3G, 3H, 3I e 3J). Estas não mostraram crescimento satisfatório no substrato areia, com menor formação de raiz, folhas com coloração verde clara, médias expandidas e caule fino (Figura 3F). No substrato solo, Bioplant<sup>®</sup>, areia + solo e areia + solo + vermiculita apesar das mudas terem folhas grandes expandidas, estas eram de coloração verde clara, mas em todos houve formação de raiz (Figuras 3G, 3H, 3I e 3J).

**Figura 3-** Plantas aclimatizadas de *Hancornia speciosa* Gomes, em casa de vegetação. Substratos com saco plástico como câmara úmida: Areia (A); Solo (B); Bioplant<sup>®</sup> (C); Areia + Solo (D); Areia + Solo + Vermiculita (E). Substratos com copo plástico como câmara úmida: Areia (F); Solo (G); Bioplant<sup>®</sup> (H); Areia + Solo (I); Areia + Solo + Vermiculita (J). Barra: 10 mm.



Fonte: Elaboração do autor.

Os maiores crescimentos das plantas de mangabeira foram verificados com o uso de saco plástico como câmara úmida, o que pode ser explicado pela maior retenção de água pelo sistema, enquanto o uso de copo plástico acarretou em perdas de água, devido o método apenas cobrir a plantas deixando o substrato exposto. O substrato Bioplant<sup>®</sup>, devido sua menor capacidade de retenção de água e maior macroporosidade, foi o mais adequado para o uso durante a aclimatização, promovendo maior porcentagem de sobrevivência das plantas, peso da massa seca das folhas, caule, raiz e relação peso da massa seca das raízes/ peso da massa seca da parte aérea.

### **Ensaio II – Inoculação de plantas de mangabeira na aclimatização com fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e *Glomus clarum***

As maiores porcentagens de sobrevivência das mudas de mangabeira foram verificadas com a inoculação dos FPCV (Tabela 9), enquanto a eficiência simbiótica mostrou-se positiva com os tratamentos de inoculação, sendo os maiores verificados com a inoculação de FPCV e FMA + FPCV.

**Tabela 9-** Porcentagem de sobrevivência e eficiência simbiótica das mudas micropropagadas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) inoculadas com fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Glomus clarum* na aclimatização, em casa de vegetação.

Tratamentos	Sobrevivência (%)	Eficiência simbiótica (%) <sup>(1)</sup>
FMA	45,0 B	12,23
FPCV	62,5 A	13,41
FMA + FPCV	47,5 B	13,18
Controle	35,0 C	-
Valor de F	1,10*	-
CV (%)	15,35	-

Notas: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, para cada variável, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. \*Significativo a 5%. CV (%)= coeficiente de variação. <sup>(1)</sup>Eficiência simbiótica = [(matéria seca de parte aérea da planta inoculada/ matéria seca da parte aérea do controle) - 1] X 100.

Fonte: Elaboração do autor.

Plantas de mangabeira inoculadas com FMA, FPCV ou co-inoculação FMA + FPCV exibiram os maiores valores médios para comprimento médio da parte aérea, peso da massa seca das folhas, peso da massa fresca, seca total e área foliar (Tabela 10).

**Tabela 10-** Comprimento médio da parte aérea, peso da massa seca das folhas, peso da massa fresca e seca total das plantas micropropagadas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) inoculadas com fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Glomus clarum* na aclimatização, em casa de vegetação.

Tratamentos	Comprimento médio da parte aérea (cm)	Massa seca das folhas (g)	Massa fresca total (g)	Massa seca total (g)	Área foliar (cm <sup>2</sup> )
FMA	7,06 A	2,47 A	8,76 A	7,21 A	8,76 A
FPCV	6,48 A	2,52 A	9,24 A	7,33 A	9,24 A
FMA+FPCV	7,06 A	2,52 A	8,87 A	7,28 A	8,87 A
Controle	4,33 B	2,01 B	7,48 B	6,57 B	7,48 B
Valor de F	2,87*	4,26*	5,53*	6,43*	2,93*
C.V (%)	46,86	19,58	15,07	7,75	54,46

Nota: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, para cada variável, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. \*Significativo a 5%. C.V (%)= coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração do autor.

A inoculação dos FPCV proporcionou alta taxa de porcentagem de sobrevivência e crescimento das mudas micropropagadas de mangabeira na fase de aclimatização (Tabelas 9 e 10). Os microrganismos utilizados neste trabalho além de sintetizarem fitormônios, como

auxinas, também são solubilizadores de fosfato, podendo disponibilizar fósforo para as plantas, promovendo um maior crescimento.

Os resultados deste trabalho corroboram com os obtidos com a inoculação de outros microrganismos promotores do crescimento vegetal durante a aclimatização de mudas micropropagadas. A inoculação de *Azospirillum brasilense*, *Bacillus megaterium* e *Klebsiella pneumoniae* em mudas de tamareira (*Phoenix dactylifera*) proporcionou aumento no crescimento e sobrevivência das mudas (FARRAG; ABEER; DARWESH, 2011).

Durante a aclimatização de três frutíferas (ameixa Mr.S 2/5 (*Prunus cerasifera* x *P. spinosa*), híbrido GF 677 (*Prunus persica* x *P. amigdalus*) e maçã MM 106 (NorthenSpy x M1) a inoculação de *A. brasilense* Sp245 possibilitou maior crescimento das mudas (VETTORI et al., 2010). A inoculação de plantas de gengibre vermelho (*Alpinia purpurata*) durante a aclimatização com *Azospirillum* sp. e *Azotobacter* sp. aumentou a taxa de sobrevivência, o diâmetro de caule, a massa seca de raiz e o número de brotações das plantas (OVANDO-MEDINA et al., 2007).

Na fase de aclimatização das plantas micropropagadas de mangabeira, o maior crescimento foi exibido pelas plantas inoculadas com *G. clarum* (Tabela 10). Resultados semelhantes foram observados por Akar-Kaçar et al. (2010) com a inoculação de FMA em mudas micropropagadas de macieira, Oliveira et al. (2011) em mudas de tapeinóquilo (*Tapeinochilos ananassae*) e Nunes et al. (2008) em porta-enxerto de pessegueiro cv. Okinawa.

A inoculação do FMA *Gigaspora margarita* mostrou-se benéfico para o crescimento de mudas de bananeira e mirtilheiro (FARIAS et al., 2014; LINS; TRINDADE; ROCHA, 2003; TRINDADE; LINS; MAIA, 2003), enquanto para o jambú (*Spilanthes acmella*) a inoculação de *G. mosseae* aumentou a taxa de sobrevivência das mudas e garantiu maior crescimento da parte aérea, número de brotações, folhas por planta e maior área foliar. Mudas micropropagadas de citrus inoculadas com este mesmo FMA apresentaram maior taxa fotossintética, transpiração e condutância estomática (WU; ZOU; WANG, 2011; YADAV; SINGH; AGGARWAL, 2012).

A co-inoculação FMA + FPCV proporcionou maior comprimento médio da maior raiz. Maior número médio de entrenós foi verificado com inoculação de FMA, enquanto que maiores valores médios de peso da massa fresca das folhas e raiz das plantas de mangabeira ocorreram com a inoculação de FPCV (Tabela 11).

A co-inoculação FMA + FPCV proporcionou aumento do crescimento das plantas de mangabeira (Tabela 3) no presente trabalho. Com isso, a inoculação do FMA em conjunto com outros microrganismos tem mostrado assegurar o estabelecimento da micorriza e aumentar os benefícios desta associação (LOCATELLI; VITOVSKI; LOVATO, 2002). Como observado

por Oliveira et al. (2010) a inoculação de *Bacillus pumilus* associada com *Glomus etunicatum* + *G. margarita* estimulou a colonização micorrízica de gengibre-magnífico (*Zinger spectabile*). Mudanças micropropagadas de banana inoculadas com *Glomus manihotis* + *Bacillus* spp. exibiram maior massa fresca e seca de parte aérea, comprimento médio de parte aérea, área foliar (RODRÍGUEZ-ROMERO; GUERRA; JAIZME-VEJA, 2005).

**Tabela 11-** Comprimento da maior raiz, número de entrenós, área foliar, peso da massa fresca das folhas e raízes de mudas micropropagadas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) inoculadas com fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Glomus clarum* na aclimatização, em casa de vegetação.

Tratamentos	Comprimento da maior raiz (cm)	Número médio de entrenós	Massa fresca das folhas (g)	Massa fresca das raízes (g)
FMA	13,26 AB	7,78 A	3,13 AB	3,12 AB
FPCV	15,01 AB	6,82 AB	3,19 A	3,54 A
FMA + FPCV	15,52 A	7,13 AB	3,08 AB	3,28 AB
Controle	11,45 B	6,25 B	2,41 B	2,69 B
Valor de F	3,28*	2,40*	2,61*	3,58*
CV (%)	29,58	23,64	29,77	24,40

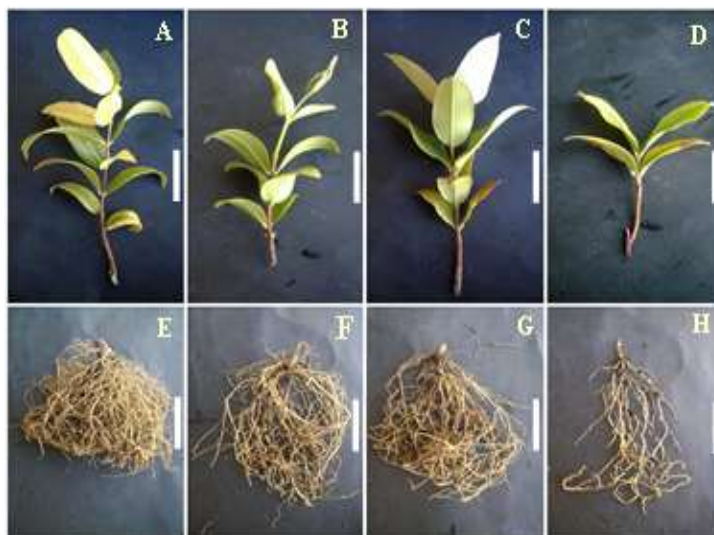
Nota: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, para cada variável, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. \*Significativo a 5%. CV (%)= coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração do autor.

No entanto, não ocorreu influência das inoculações para número de folhas, número de gemas, diâmetro de caule, volume de raiz, peso da massa fresca do caule, peso e raiz. Visualmente as mudas de mangabeira aos 120 dias inoculadas com FMA, FPCV e FMA + FPCV exibiram maior comprimento médio de parte aérea, formação de folhas expandidas de coloração verde, entrenós (Figuras 4A, 4B e 4C) e formação de raízes (Figuras 4E, 4F e 4G). Enquanto que as mudas do tratamento controle eram menores, com menor número de folhas (Figura 4D) e formação de raízes (Figura 4H).

A inoculação das mudas micropropagadas de mangabeira com FPCV na fase de aclimatização foi benéfica por proporcionar maior porcentagem de sobrevivência, área foliar, comprimento médio da parte aérea, peso da massa fresca das folhas, raízes, total e seca das folhas e total das plantas. A co-inoculação, no entanto, garantiu maior comprimento médio da parte aérea, maior raiz, área foliar, peso da massa fresca total das plantas e seca das folhas e total.

**Figura 4-** Plantas de mangabeira inoculadas com fungos promotores do crescimento vegetal e fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Glomus clarum*, aclimatizadas em casa de vegetação. FMA (A); FPCV (B); FMA + FPCV (C); Controle (D). Formação de raízes após os tratamentos de inoculação. FMA (E); FPCV (F); FMA + FPCV (G); Controle (H). Barra= 10 mm.



Fonte: Elaboração do autor.

#### **4 CONCLUSÃO**

O substrato Bioplant<sup>®</sup> e o saco plástico como câmara úmida são os mais adequados para a aclimatização de plantas de mangabeira, proporcionando maior porcentagem de sobrevivência e crescimento das plantas.

A inoculação de FPCV possibilitou maior porcentagem de sobrevivência, enquanto a co-inoculação FMA + FPCV beneficiou o maior crescimento das plantas micropropagadas de mangabeira durante a aclimatização.

## REFERÊNCIAS

- AKAR-KAÇAR, Y.; AKPINAR, C.; AGAR, A.; YALÇIN-MENDI, Y.; SERÇE, S.; ORTAS, I. The effect of mycorrhiza in nutrient uptake and biomass of cherry rootstocks during acclimatization. **Romain Biotechnological Letters**, Bucharest, v. 15, n. 3, p. 5247-5252, 2010.
- ANZANELLO, R.; SOUZA, P.; V.; CASAMALI, B. Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em porta-enxertos micropropagados de videira. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 2, p. 409-415, 2011.
- BRAGA, F. T.; PASQUAL, M.; DE CASTRO, E. M.; RAFAEL, G. C.; FAVERO, A. C.; VALENTE, T. C. T. Alterações morfofisiológicas de plantas de abacaxizeiro influenciadas por diferentes substratos durante o processo de aclimatização. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 5, p. 863-868, 2011.
- CATUNDA, P. H. A.; MARINHO, C. S.; DE ASSIS GOMES, M. M.; DE CARVALHO, A. J. C. Brassinosteróide e substratos na aclimatização do abacaxizeiro 'Imperial'. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 3, p. 345-352, 2008.
- COSTA, C. M. C.; CAVALCANTE, U. M. T.; GOTO, B. T.; SANTOS, V. F. dos; MAIA, L. C. Fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada em mudas de mangabeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 3, p. 225-232, 2005.
- FARIAS, D. H.; PINTO, M. A. B.; CARRA, B.; SCHUCH, M. W.; SOUZA, P. V. D. Desenvolvimento de mudas de mirtilheiro inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 3, p. 655-663, 2014.
- FARRAG, H. M.; ABEER, H. E.; DARWESH, R. S. Growth promotion of date palm plantlets *ex vitro* by inoculation of rizosphere bacteria. **Journal of Horticultural Science and Ornamental Plants**, Dubai, v. 3, n. 2, p. 130-136, 2011.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FREIRE, K. C. S.; COELHO, G. G.; RUSSO, S. L.; SILVA, A. V. C.; LÉDO, A. S.; SÁ, A. J.; MACHADO, C. A. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos e aclimatação de plântulas de mangaba oriundas da cultura de embrião (*Hancornia speciosa* Gomes). **Scientia Plena**, São Cristovão, v. 7, n. 11, p. 1-7, 2011.
- GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R. J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, n. 8, p. 1968-1977, 2007.
- LÉDO, A. da S.; SECA, G. S. V.; BARBOZA, S. B. S. C.; SILVA JUNIOR, J. F. da. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 989-993, 2007.

- LIMA, F. C.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R.; CAVALCANTE, U. M.; ALBUQUERQUE, C. C.; WILLADINO, L. *Anthurium andraeanum* Lindl. Cv. Eidibel *in vitro* rooting and acclimatization with arbuscular mycorrhizal fungi. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 1, n. 1, p. 13-16, 2006.
- LINS, G. D. L.; TRINDADE, A. V.; ROCHA, H. S. Utilização de *Gigaspora margarita* em plantas micropropagadas de bananeira em diferentes estádios de enraizamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 143-147, 2003.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Carlisle, v. 30, p. 421-327, 1980.
- LOCATELLI, L. M.; VITOVSKI, C. A.; LOVATO, P. E. Sistema radicular de porta-enxertos micropropagados de macieira colonizados com fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 9, p. 1239-1245, 2002.
- LOPES, J. L. W.; GUERRINI, I. A.; SAAD, J. C. C.; SILVA, M. D. Atributos químicos e físicos de dois substratos para produção de mudas de eucalipto. **Cerne**, Viçosa, v. 14, n. 4, p. 358-367, 2008.
- MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, E. M.; ZARPELON, T. G.; SIQUEIRA, L. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, Santa Maria, v. 29, n. 6, p. 843-851, 2005.
- MARTINS, J. P. R.; SANTOS, B. R.; BARBOSA, S.; MÁXIMO, W. P. F.; BEIJO, L. A.; PAIVA, R. Crescimento e aspectos sintomatológicos na aclimatização de Ipê-roxo. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 4, p. 435-442, 2011.
- MATOS, R. M. B.; SILVA, E. M. R.; BRASIL, F. C. Micorriza arbuscular e matéria orgânica na aclimatização de mudas de bananeira, cultivar Nanição. **Bragantia**, Campinas, v. 61, n. 3, p. 277-283, 2002.
- MOREIRA, M. A.; CARVALHO, J. G.; PASQUAL, M.; FRÁGUAS, C. B.; SILVA, A. B. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 875-879, 2006.
- MOURA, L. C.; TITON, M.; FERNANDES, J. S. C.; SANTANA, R. C.; OLIVEIRA, M. L. R. Micropropagação de sucupira-preta por meio de gemas axilares. **Revista Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 12, p. 1691-1698, 2012.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 15, p 473-479, 1962.
- NASCIMENTO, A. C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; PORTO, J. M. P.; NOGUEIRA, G. F.; SOARES, F. P. BAP e AIB no cultivo *in vitro* de *Eugenia pyriformis* Cambess. **Revista Acadêmica: Ciência Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 6, n. 2, p. 223-228, 2008.

NUNES, J. L. S.; SOUZA, P. V. D.; MARODIN, G. A. B.; FACHINELLO, J. C. Inoculação de fungos micorrízicos aubusculares em porta-enxerto de pessegueiro cv. Okinawa. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 4, p. 1100-1106, 2008.

OLIVEIRA, J. P. de; COSTA, F. H. da S.; PEREIRA, J. E. S. Crescimento de mudas micropropagadas de bananeira aclimatizadas nas condições da Amazônia Sul Ocidental sob a influência de diferentes substratos e recipientes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p.459-465, 2008.

OLIVEIRA, J. R. G. de; MORAES, M. T. A. de L.; MELO, N. F. de; MELO, A. M. Y. Fungos micorrízicos arbusculares e rizobactérias promotoras de crescimento na aclimatização de *Zingiber spectabile*. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 3, p687-694, 2010.

OLIVEIRA, J. R. G.; MORAIS, T. A. L.; MELO, N. F.; YANO-MELO, A. M. Acclimatization of *Tapeinochilos ananassae* plantlets in association with arbuscular mycorrhizal fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 9, p. 1099-1104, 2011.

OVANDO-MEDINA, I.; ADRIANO-ANAYA, L.; CHAVEZ-AGUILAR, A.; OLIVALLAVEN, A.; AYORA-TALAVERA, T.; DENDOOVEN, L.; GUTIÉRREZ-MICELI, F.; SALVADOR-FIGUEROA, M. *Ex vitro* survival and early growth of *Alpinia purpurata* plantlets inoculated with *Azotobacter* and *Azospirillum*. **Pakistan Journal Biological Sciences**, Dubai, v. 10, n. 19, p. 3454-3457, 2007.

PELIZZA, T. R.; DAMIANI, C. R.; RUFATO, A. R.; AFFONSO, L. B.; HAWERROTH, F. J.; SCHUCH, M. W. Aclimatização e crescimento de plântulas de mirtilheiro ‘climax’ micropropagadas em função do substrato e da cobertura plástica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 3, p. 898-905, 2011.

PELIZZA, T. R.; MUNIZ, J.; CAMARGO, P.; KRETZSCHMAR, A. A.; RUFATO, L. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização de plântulas micropropagadas de amoreira-preta ‘xavante’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 1, p. 333-337, 2013.

PEREIRA, M. C. T.; NIETSCHE, S.; FRANÇA, A. C.; NUNES, C. F.; LIMA, C.; GONÇALVES, V. D.; SALLES, B. P.; MORAIS, D. L. B.; KOBAYASHI, M. K. Aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira sob diferentes condições de luminosidade. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 238-240, 2005.

RADWAN, T. E. L. S.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, p.987-994, 2004.

ROCHA, M. A. C.; COSTA, M. A. P. C.; SILVA, S. A.; LEDO, C. A. S.; MOREIRA, M. J. S.; BASTOS, L. P. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 769-774, 2008.

RODRÍGUEZ-ROMERO, A. S.; GUERRA, M. S.; JAIZME-VEJA, M. C. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobacteria on banana growth and nutrition. **Agronomy for Sustainable Development**, Les Ulis Cedex A, v. 25, n. 3, p. 395-399, 2005.

SANTOS, P. C. G. dos; ALVES, E. U.; GUEDES, R. S.; SILVA, K. B.; CARDOSO, E. de A.; LIMA, C. R. de. Qualidade de sementes de *Hancornia speciosa* Gomes em função do tempo de secagem. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 343-352, 2010.

SCARANARI, C.; LEAL, P. A. M.; PELLEGRINO, G. Q. Estudo de simulações de microclimas em casas de vegetação visando à aclimação de mudas micropropagadas de bananeira cv Grande Naine. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 4, p. 1001-1008, 2008.

SCHUCK, M. R.; LIPSKI, B.; DA SILVA, A. L. L.; DE CARVALHO, D. C.; BIASI, L. A. Aclimação de plantas micropropagadas de videira cv. Bordô (*Vitis labrusca* L.) em diferentes substratos. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 3, n. 4, p. 206-212, 2012.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; ARAUJO, A. G.; BRAGA, F. T.; CASTRO, E. M.; ALBERT, L. H. B. Morfofisiologia e anatomia foliar de mudas micropropagadas e aclimatizadas de abacaxizeiro cv. Smooth Cayenne em diferentes substratos. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 5, p. 580-586, 2012.

SILVA, A. L. L.; OLIVEIRA, Y.; COSTA, J. L.; SCHEIDT, G. N.; CARVALHO, D. C.; SANTOS, J. D.; GUERRA, E. P. Pré-aclimação e aclimação em cultivo hidropônico de plantas micropropagadas de *Eucalyptus saligna* Sm. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 179-184, 2011.

SILVA, J. V.; HERNANDEZ, F. F. F.; BEZERRA, F. C.; DINIZ, J. D. N. Aclimação *ex vitro* de mudas de antúrio em diferentes substratos. **Revista Ciência Agrônômica**, Recife, v. 38, n. 2, p. 188-191, 2007.

SILVA, R. L. O.; LUZ, J. S.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 20, n. 3, p. 649-655, 2006.

SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, E. C. S. F. T.; MALDANER, J. Substratos na aclimação de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida *in vitro* sob diferentes doses de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 5, p. 1416-1423, 2006.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A. de; NOGUEIRA, R. C.; EMRICH, E. C.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes de caulinares de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, 2007a.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; STEIN, V. C.; NERY, F. C.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA<sub>3</sub> e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1847-1852, 2009.

SOBRINHO, S. P.; LUZ, P. B.; SILVEIRA, T. L. S.; RAMOS, D. T.; NEVES, L. G.; BARELLI, M. A. A. Substratos na produção de mudas de três espécies arbóreas do cerrado. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Londrina, v. 5, n. 2, p. 238-243, 2010.

TRINDADE, A. V.; LINS, G. D. L.; MAIA, I. C. S. Substratos e fungo micorrízico arbuscular em mudas micropropagadas de bananeira na fase de aclimação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 137-142, 2003.

VETTORI, L.; RUSSO, A.; FELICI, C.; FIASCHI, G.; MORINI, S.; TOFFANIN, A. Improving micropropagation: Effect of *Azospirillum brasilense* sp245 on acclimatization of rootstocks of fruit tree. **Journal of Plant Interactions**, London, v. 5, n. 4, p. 249-259, 2010.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; DE ARAÚJO, A. G.; PIO, L. A. S. Micropropagação da amoreira-preta (*Rubus* spp.) e efeito de substratos na aclimação de plântulas. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 47-53, 2006.

WU, Q. S.; ZOU, Y. N.; WANG, G. Y. Arbuscular mycorrhizal fungi and acclimatization of micropropagated citrus. **Communications in soil science and plant analysis**, Philadelphia, v. 42, n. 15, p. 1825-1832, 2011.

YADAV, K.; SINGH, N.; AGGARWAL, A. Arbuscular mycorrhizal technology for the growth enhancement of micropropagated *Spilanthes acmella* Murr. **Plant Protection Science**, Praga, v. 48, n. 1, p. 31-36, 2012.

## CAPÍTULO 4

### **PLANTAS MICROPROPAGADAS DE MANGABEIRA INOCULADAS *in vitro* E *ex vitro* COM FUNGOS PROMOTORES DO CRESCIMENTO E ACLIMATIZADAS COM *Glomus clarum***

**RESUMO:** Durante a aclimatização de plantas micropropagadas, a inoculação de microrganismos benéficos pode acelerar sua adaptação e crescimento. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) colonizam o solo, garantindo uma maior zona de absorção de nutrientes. Os microrganismos promotores do crescimento proporcionam supressão de doenças, aumento da produção e/ou alteração da concentração de fitormônios e absorção de nutrientes. A mangabeira, uma árvore de porte médio, ocorre naturalmente em solos marginais para fins agrícolas, é resistente ao fogo e tem aplicações agro-industriais. Objetivou-se com este trabalho, avaliar a inoculação *in vitro* e *ex vitro* de fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV), isolados ou em presença do FMA *Glomus clarum*, na aclimatização de plantas micropropagadas de mangabeira. No Ensaio (I), quatro FPCV (MA2, MA5, MF1 e MF3) foram inoculados no colo das plantas micropropagadas *in vitro* e após 15 dias foram aclimatizadas em presença ou ausência de *G. clarum*, em substrato Bioplant<sup>®</sup>. As plantas de mangabeira no Ensaio (II) foram aclimatizadas em substrato Bioplant<sup>®</sup> e submetidas a cinco tratamentos de inoculação com FPCV: MA2, MA5, MF1, MF3 e controle, em presença ou ausência de *G. clarum*. A inoculação *in vitro* de MF1 beneficiou as plantas aclimatizadas, sendo observados o maior comprimento médio da parte aérea, peso da massa fresca da parte aérea e massa seca das raízes. Quando a inoculação *in vitro* do isolado MF1 foi associada à aclimatização das plantas que receberam *G. clarum*, proporcionou maior sobrevivência e enraizamento das plantas de mangabeira. A inoculação *ex vitro* de MA2 possibilita alta taxa de sobrevivência e enraizamento das plantas, enquanto a inoculação isolada de *G. clarum* beneficia o maior número médio de gemas e entrenós em plantas aclimatizadas de mangabeira.

**Palavras-chave:** *Hancornia speciosa* Gomes. Cerrado. Micropropagação. Promoção do crescimento vegetal. Fungo micorrízico arbuscular.

## 1 INTRODUÇÃO

O sucesso da micropropagação depende da eficiência na fase crítica de aclimatização, uma vez que esta etapa envolve a transição de condições *in vitro* para *ex vitro*. Nesta fase as plantas necessitam ativar a fotossíntese e a absorção de água e nutrientes, estando mais suscetíveis ao déficit hídrico. Assim, o sucesso da etapa de aclimatização depende da eficiência do enraizamento (OLIVEIRA et al., 2010).

Na propagação *in vitro*, porém, devido aos métodos de desinfestação utilizados, ocorre a retirada de microrganismos que podem beneficiar a cultura, como os promotores do crescimento vegetal. A reintrodução destes microrganismos durante a micropropagação de plantas tem sido recomendada, pois entre os efeitos benéficos está o aumento da tolerância a estresses bióticos e abióticos, maior crescimento das plantas, área foliar, número de folhas e matéria seca e aumento da resistência a patógenos no transplante, implicando em redução do tempo de aclimatização e maior sobrevivência das mudas após o transplante (MARIANO et al., 2004; SANTOS et al., 2005; WEBER et al., 2003).

O uso de microrganismos benéficos durante a aclimatização de plantas, isolados ou combinados, exercem funções importantes para a sobrevivência e aumentos de produtividade. Durante a aclimatização, fungos micorrízicos arbusculares (FMA) podem aumentar a superfície de contato com o solo, favorecendo as plantas com uma maior absorção de nutrientes. De outra forma, os microrganismos promotores do crescimento de plantas proporcionam supressão de doenças, aumento da produção e/ou alteração da concentração de fitormônios e eficiência na absorção de nutrientes (LOCATELLI; LOVATO, 2002; OLIVEIRA et al., 2010). Estes microrganismos têm sido usados com sucesso para melhorar a aclimatização de várias espécies de fruteiras micropropagadas (CAVALCANTE; GOTO; MAIA, 2009; STANCATO; SILVEIRA, 2010).

A mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) pertence à Família Apocynaceae, sendo uma frutífera com grande potencial para exploração econômica. Ela pode ser encontrada naturalmente no Brasil, cuja distribuição ocorre em áreas da caatinga, cerrado, mata atlântica e floresta amazônica. Seus frutos são apreciados pelo seu aroma, sabor e digestibilidade, podendo ser consumidos *in natura* ou processados na forma de sorvete, pudim, geleia, vinho, vinagre, xarope e licor (BARROS et al., 2010; ENDRINGER; PEZZUTO; BRAGA, 2009; SANTOS et al., 2010). Sua madeira é utilizada na carpintaria para confecção de caixas e para produção de carvão, e o látex utilizado para fins ornamentais e pode ser usado em aplicações comerciais (BARROS et al., 2010; SOARES et al., 2007; VIEIRA et al., 2006). O fruto da mangabeira é

saboroso e nutritivo, sendo consumido na forma de sucos, coquetéis, doces em caldas, geleia, sorvetes, licores, vinhos, xaropes e *in natura* (COSTA et al., 2005; SANTOS et al., 2009). Esta espécie possui também aplicabilidade na farmacologia e na extração de látex para borracha, demonstrando seu potencial de aproveitamento na agroindústria (PINHEIRO, 2009).

Objetivou-se com este trabalho, avaliar a inoculação *in vitro* e *ex vitro* de fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV), isoladamente ou em presença do FMA *Glomus clarum*, na aclimatização de plantas micropropagadas de mangabeira.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As plantas utilizadas eram provenientes de sementes preestabelecidas *in vitro*, obtidas de frutos coletados de diferentes plantas de mangabeira na Fazenda Gameleira, município de Montes Claros de Goiás-GO. Após a despolpa e desinfecção superficial, as sementes foram transferidas para tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 20 mL de meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com a metade da concentração original dos sais (MS ½), vitaminas, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 3,5 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,03 antes da autoclavagem. Após a inoculação, as sementes foram mantidas sob fotoperíodo de 16 h, temperatura de 25 ± 3 °C, umidade relativa de 45 a 46 % e radiação fotossintética ativa de 45-55 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Com a germinação das sementes, as plantas obtidas foram repicadas e os segmentos nodais com duas gemas laterais transferidos para tubos de ensaio contendo meio de cultivo WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), com a metade da concentração original dos sais (WPM ½), mais vitaminas, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 3,5 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,03 antes da autoclavagem. As culturas permaneceram em sala de crescimento por 30 dias, nas condições descritas anteriormente.

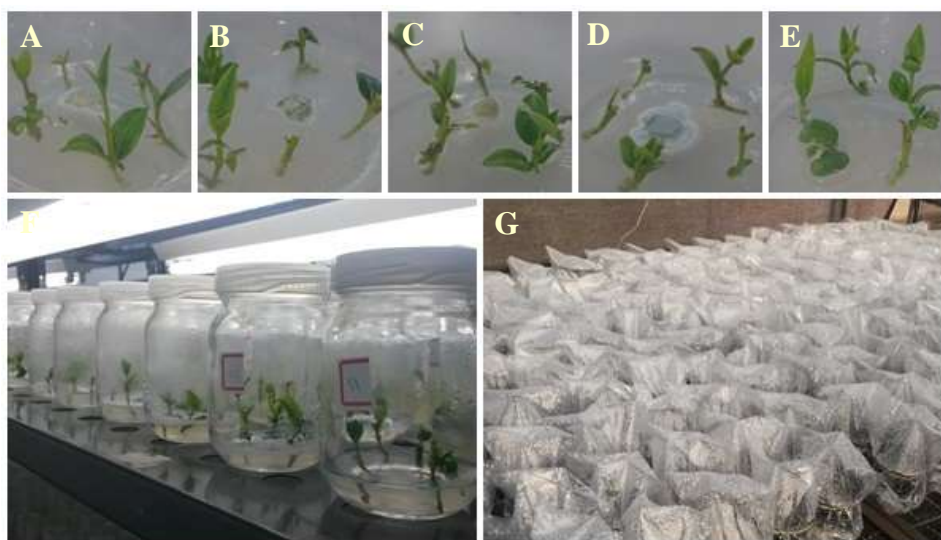
Para o estabelecimento dos ensaios, segmentos nodais contendo duas gemas laterais foram transferidos de tubos de ensaio para frascos (12 x 50 mm) vedados com tampa plástica contendo 15 mL de meio de cultivo WPM ½. Os frascos contendo cinco segmentos nodais permaneceram por 15 dias, nas mesmas condições de crescimento descritas anteriormente.

#### **Ensaio I – Inoculação *in vitro* de fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) em frascos contendo plantas de mangabeira**

Os fungos promotores do crescimento (MA2, MA5, MF1 e MF3) foram multiplicados em meio BDA sólido (infusão de 200 g de batata, dextrose 20 g e ágar 15 g). A partir das colônias, discos contendo micélio e esporos (com 5 mm de diâmetro) foram depositados no centro dos frascos com 20 mL de meio de cultivo WPM ½, contendo cinco plantas de mangabeira cultivadas *in vitro* (Figura 1A e 1F). Frascos contendo plantas não inoculadas foram utilizados como controle. Após a inoculação, os frascos com as plantas foram mantidos em sala

de crescimento sob fotoperíodo de 16 h, temperatura de  $25 \pm 3$  °C, umidade relativa de 45 a 46 % e radiação fotossintética ativa de  $45\text{-}55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 1F).

**Figura 1-** Inoculação *in vitro* de fungos promotores do crescimento vegetal em plantas de mangabeira. MA2 (A); MA5 (B); MF1 (C); MF3 (D) e controle (E). Plantas de mangabeira acondicionadas em sala de crescimento após inoculação (F) e aclimatização das plantas inoculadas *in vitro* (G).



Fonte: Elaboração do autor.

Após 15 dias em sala de crescimento, as plantas foram transferidas para casa de vegetação, sendo aclimatizadas em substrato Bioplant<sup>®</sup>, em presença ou ausência de *G. clarum*. Todos os vasos foram envoltos com saco plástico de 1 L.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial  $5 \times 2$  (cinco tratamentos de inoculação *in vitro* x ausência ou presença de *G. clarum*), contendo cada 20 repetições, cada uma constituída por um vaso com uma planta. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando as médias pelo teste Tukey (5%), utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2011).

### **Ensaio II – Inoculação *ex vitro* de fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) em frascos contendo plantas de mangabeira**

Após 20 dias em sala de crescimento, os frascos contendo plantas de mangabeira foram transferidos para armário com radiação fotossintética ativa de  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16 h, temperatura de  $27 \pm 3$  °C e umidade relativa de 48 a 50 %. As tampas de polipropileno

dos frascos foram destravadas, posteriormente deixadas semi-abertas para, em seguida, serem retiradas, com 24 h de intervalo entre cada uma das etapas.

Para inoculação *ex vitro*, foram utilizados quatro FPCV (MA2, MA5, MF1 e MF3), isolados de solo próximo a raízes de plantas de mangabeira, conforme descrito por Cabral (2012) e mantidos em tubos de ensaio contendo meio de cultura GL (glicose 10 g; extrato de levedura 2 g e ágar 15 g) a 5 °C.

Cada isolado foi cultivado separadamente, em erlenmeyer de 125 mL contendo meio líquido GL (extrato de levedura 2 g e glicose 10 g) e incubados a 28 °C por 72 h. No momento da inoculação das mudas, o inoculante foi padronizado para  $10^8$  ufc (unidade formadora de colônia)  $\text{mL}^{-1}$ , utilizando câmara de Neubauer.

As plantas de mangabeira foram aclimatizadas em substrato Bioplant® e submetidas a cinco tratamentos de inoculação com FPCV (MA2, MA5, MF1, MF3 e controle não inoculado), em presença ou ausência de *G. clarum*. Todos os vasos foram envoltos com saco plástico de 1 L. As plantas que receberam *G. clarum* foram inoculadas no orifício de transplântio com 3,3 g de inóculo ( $10$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  de solo). Para a inoculação dos FPCV, foi adicionado 15 mL de inoculante líquido de cada isolado fúngico a  $10^8$  ufc  $\text{mL}^{-1}$  isoladamente no colo de cada planta.

Ao final de 120 dias, as plantas foram avaliadas para porcentagem de sobrevivência, enraizamento, comprimento médio da parte aérea, maior raiz, número médio de folhas, gemas, entrenós, diâmetro médio de caule, volume de raiz, peso da massa fresca e seca das folhas, caule, raiz, parte aérea, total, relação peso da massa fresca da parte aérea/peso da massa fresca total (PMFP/PMFT), peso da massa seca da parte aérea/seco total (PMSP/PMST), peso da massa fresca das raízes/peso da massa fresca da parte aérea (PMFR/PMFP), peso da massa seca das raízes/peso da massa seca da parte aérea (PMSR/PMSP), área foliar e razão da área foliar.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 2 x 5 (ausência ou presença de *G. clarum* x inoculação de isolados FPCV), com 20 repetições por tratamento, cada uma constituída por um vaso com uma planta. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando as médias pelo teste de Tukey (5%), utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2011).

Em ambos os ensaios, o inoculante micorrízico utilizado foi *G. clarum*, procedente da coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo da UFLA – Universidade Federal de Lavras, e doada à UNESP - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia, Campus de Ilha Solteira.

As plantas que receberam o FMA *G. clarum* foram inoculadas no orifício de transplântio com 3,3 g de inóculo ( $10$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  de solo). Os vasos foram mantidos em casa de vegetação

com temperatura de  $35 \pm 3$  °C, umidade relativa de 20 a 25 % e sombreamento de 50 %. A irrigação foi manual, ocorrendo três dias na semana com volume de 15 mL por vaso. A cada duas semanas a irrigação foi realizada com solução nutritiva em todos os tratamentos (Tabela 1), composta pelos sais do meio WPM  $\frac{1}{2}$ , no volume de 15 mL por vaso.

**Tabela 1-** Sais do meio de cultivo WPM  $\frac{1}{2}$  utilizados para preparo da solução nutritiva.

Solução	Componentes	Concentração na solução estoque (para 1 litro)	Volume para 1 litro
A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ;	10,00 g L <sup>-1</sup>	20 mL
	Ca[NO <sub>3</sub> ].4H <sub>2</sub> O	13,90 g L <sup>-1</sup>	
B	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	24,75 g L <sup>-1</sup>	20 mL
C	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,40 g L <sup>-1</sup>	20 mL
D	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ;	17,0 g L <sup>-1</sup>	5 mL
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ;	0,65 g L <sup>-1</sup>	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25 g L <sup>-1</sup>	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O;	37,00 g L <sup>-1</sup>	
E	MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O;	2,23 g L <sup>-1</sup>	5 mL
	ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O;	0,86 g L <sup>-1</sup>	
	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,025 g L <sup>-1</sup>	
F	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,78 g L <sup>-1</sup>	5 mL
	Na <sub>2</sub> .EDTA	3,72 g L <sup>-1</sup>	

Fonte: Elaboração do autor.

A cada sete dias foi realizado um furo neste, até chegar a sua abertura plena, totalizando 4 furos. Após 30 dias os copos, sacos plásticos e o sombreamento foram retirados e passou a ser utilizada irrigação automática todos os dias e solução nutritiva (Figura 1), a cada duas semanas, no volume de 15 mL.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Ensaio I – Inoculação *in vitro* de fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) em frascos contendo plantas de mangabeira

Não ocorreu mortalidade de plantas de mangabeira quando inoculadas *in vitro* com os fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV). A porcentagem de sobrevivência e enraizamento, comprimento médio da parte aérea e peso da massa fresca da parte aérea foram influenciados pelos fatores isolados x presença ou ausência de *G. clarum* (Tabela 2).

**Tabela 2-** Porcentagem de sobrevivência, enraizamento, comprimento médio da parte aérea e peso da massa fresca da parte aérea de plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas *in vitro* com fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e aclimatizadas em ausência ou presença de *Glomus clarum*, em casa de vegetação.

Isolados	<i>Glomus clarum</i>			
	Ausência	Presença	Ausência	Presença
	Sobrevivência (%)		Enraizamento (%)	
MA2	66,7 Ba	66,7 Ca	60,0 Ba	60,0 Ca
MA5	26,7 Da	26,7 Ea	26,7 Ca	26,7 Ea
MF1	66,7 Bb	86,7 Aa	46,7 Bb	80,0 Aa
MF3	60,0 Ca	53,3 Db	46,7 Bb	53,3 Da
Controle	73,3 Aa	72,3 Ba	73,3 Aa	73,3 Ba
Valor de F	218,45*		335,70*	
CV (%)	1,40		2,18	
	Comprimento médio da parte aérea (cm)		Massa fresca da parte aérea (g)	
	Ausência	Presença	Ausência	Presença
	MA2	5,07 Ba	6,40 Aa	3,53 Ba
MA5	3,73 Ba	3,07 Ba	3,29 Ba	3,18 Aa
MF1	6,10 Aa	3,50 Bb	4,17 Aa	3,16 Ab
MF3	5,23 Ba	4,23 Ba	3,88 Aa	3,35 Aa
Controle	6,97 Aa	4,60 Bb	3,85 Aa	3,29 Aa
Valor de F	5,29*		11,11*	
CV (%)	17,19		9,40	

Nota: Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, para cada variável, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey. \*Significativo a 5%. CV (%)= coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração do autor.

Para porcentagem de sobrevivência e de enraizamento os maiores valores foram detectados na presença de MF1 com *G. clarum* e no controle com ou sem *G. clarum*, enquanto os menores valores para nas plantas inoculadas com MA5 independente da presença ou

ausência do FMA. Os maiores valores de comprimento médio de parte aérea foram verificados no controle e no tratamento que recebeu MF1, ambos não inoculados com FMA, e no tratamento com MA2 inoculado com *G. clarum*, que não diferiu do não inoculado. Para peso de massa fresca de parte aérea, não houve diferença entre os tratamentos de inoculação com FPCV, na presença de FMA, os maiores valores detectados foram na presença de MF1 sem inoculação de FMA, o qual não diferiu do controle sem inoculação ou inoculadas com MF3. Para estas quatro variáveis, na presença ou ausência de FMA, os menores valores foram detectados na presença de MA5 (Tabela 2).

A utilização de co-inoculação entre FMA e outros microrganismos pode não ser benéfica, devido a possibilidade de ocorrer antagonismos destes microrganismos com o FMA (VÁSQUEZ et al., 2000). Outros autores como Martínez-Medina et al. (2011) citam que a co-inoculação FMA e *Trichoderma harzianum* promoveu aumento da parte aérea de plantas de melão, enquanto que a inoculação de plantas de abacaxi durante a aclimatização com mix de FMA e *Piriformospora indica* foi considerada promissora por produzir mudas de alta qualidade (MOREIRA et al., 2015).

Inoculações de *Gliocladium catenulatum*, *T. harzianum*, *Bacillus subtilis* e *T. harzianum* com *B. subtilis* proporcionaram maior crescimento de mudas de morango micropropagadas durante a aclimatização (VESTBERG et al., 2004). Mudas micropropagadas de banana inoculadas com *Glomus manihotis* e *Bacillus* spp. exibiram maior massa fresca e seca de parte aérea e comprimento médio de parte aérea e foliar (RODRÍGUEZ-ROMERO; GUERRA; JAIZME-VEJA, 2005).

Entre os tratamentos sem inoculação de *G. clarum* foi verificado o maior crescimento das plantas micropropagadas de mangabeira na fase de aclimatização, com aumento do peso da massa fresca das folhas, caule, raiz e total, e peso seco de folhas, raiz, parte aérea e total das plantas de mangabeira (Tabela 3).

A inoculação isoladamente de *G. clarum* na aclimatização de plantas de mangabeira não promoveu crescimento (Tabela 3), mesmo também observado por Stancato e Silveira (2010) e Kunze et al., (2014) durante a aclimatização mudas de antúrio e abacaxi, respectivamente. A inoculação de *G. clarum* também não favoreceu o crescimento de mudas de *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum*, porém a presença do FMA diminuiu a mortalidade das plantas durante períodos de estresse (GONÇALVES et al., 2015). A inoculação de FMA inibiu o crescimento do porta enxerto de macieira M.9, porém sua presença foi positiva para o crescimento do porta enxerto Marubakaido, durante a aclimatização (LOCATELLI; LOVATO, 2002). Maior porcentagem de enraizamento, comprimento de raízes e número de raízes laterais,

comprimento médio de parte aérea, área foliar, massa fresca e seca de parte aérea, caule e raízes de plantas de crisântemo foi obtida com a inoculação de *Glomus* sp. (SOHN et al., 2003)

**Tabela 3-** Peso da massa fresca das folhas, caule, raízes, total das plantas e seca das folhas, raízes, parte aérea e total e das relações peso da massa seca da parte aérea/peso da massa seca total das plantas (PMSP/PMST) e peso da massa seca das raízes/peso da massa seca da parte aérea (PMSR/PMSP) de plantas micropropagadas de mangabeira aclimatizadas, em presença ou ausência de *Glomus clarum*, em casa de vegetação.

<i>G. clarum</i>	Massa fresca das folhas (g)	Massa fresca do caule (g)	Massa fresca das raízes (g)	Massa fresca total (g)
ausência	2,13 A	1,61 A	1,75 A	5,49 A
presença	1,79 B	1,54 B	1,54 B	4,88 B
Valor de F	9,81*	15,15*	12,47*	12,11*
CV (%)	14,88	3,16	9,75	9,29
	Massa seca das folhas (g)	Massa seca das raízes (g)	Massa seca da parte aérea (g)	Massa seca total (g)
ausência	1,62 A	1,49 A	3,07 A	4,55 A
presença	1,50 B	1,45 B	2,92 B	4,38 B
Valor de F	13,23*	8,55*	15,05*	15,42*
CV (%)	5,7	2,36	3,24	2,73
	PMSP/PMST	PMSR/PMSP		
ausência	0,56 B	0,49 B		
presença	0,60 A	0,50 A		
Valor de F	1,04*	5,15*		
CV (%)	5,49	2,45		

Nota: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey. \*Significativo a 5%. CV (%)= coeficiente de variação.

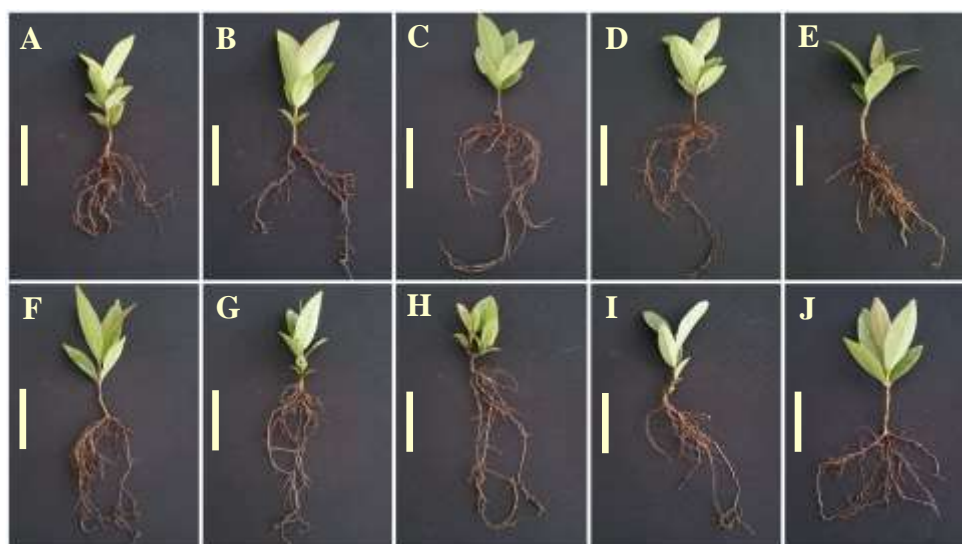
Fonte: Elaboração do autor.

Para a relação peso da massa seca da parte aérea/peso da massa seca total (PMSP/PMST) e peso da massa seca das raízes/ peso da massa seca da parte aérea (PMSR/PMSP) a presença do *G. clarum* na aclimatização das plantas promoveu maiores valores (Tabela 3). Isto se deve ao fato das plantas aclimatizadas com FMA terem uma maior proporção de raiz do que de parte aérea, como pode ser observado na Figura 2.

A inoculação dos isolados MF1, MF3 *in vitro* e o controle mostraram maior peso da massa seca das raízes (g), enquanto MA2 proporcionou maior relação peso da massa fresca da parte aérea/peso da massa fresca total (PMFP/PMFT) de plantas micropropagadas de mangabeira. Os mesmos isolados proporcionaram os maiores valores para eficiência simbiótica (Tabela 4). Os benefícios de FPCV durante a fase de aclimatização, também foram relatados

por outros autores, como Fortes et al. (2007) que obtiveram maior sobrevivência e enraizamento de microestacas de *Eucalyptus* sp. com a inoculação de isolados de *Trichoderma* spp. e por Gravel, Antoun e Tweddell (2007) que verificaram aumento do peso fresco de parte aérea e raízes de plantas de tomate inoculadas com *Trichoderma atroviride*.

**Figura 2-** Plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas *in vitro* com fungos promotores do crescimento vegetal e aclimatizadas em ausência ou presença de *Glomus clarum*, em casa de vegetação. Ausência de *G. clarum*: MA2 (A); MA5 (B); MF1 (C); MF3 (D) e controle não inoculação (E). Presença de *G. clarum*: MA2 (F); MA5 (G); MF1 (H); MF3 (I) e controle inoculado *G. clarum* (J). Barra= 10 mm.



Fonte: Elaboração do autor.

Como demonstrado neste trabalho, ocorreu formação de raízes nas plantas aclimatizadas de mangabeira (Tabela 2), as quais foram aclimatizadas sem raízes. Tal resultado pode ser explicado devido o fato dos isolados fúngicos utilizados terem a capacidade de sintetizar AIA. Este fitormônio promove o crescimento de raízes e proliferação de pelos radiculares, o que pode melhorar a absorção de nutrientes e água do solo e, conseqüentemente, o crescimento da planta (OLIVEIRA et al., 2012). Maior crescimento das plantas inoculadas de mangabeira ocorreu quando foram inoculadas com os FPCV (Tabelas 2 e 4), sendo que os isolados fúngicos utilizados são, ainda, solubilizadores de fosfato, podendo disponibilizar em maior quantidade o P para as mudas, promovendo seu aumento.

**Tabela 4-** Peso da massa seca das raízes, relação peso da massa fresca da parte aérea/peso da massa fresca total (PSPA/PST) e Eficiência simbiótica de plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas *in vitro* com fungos promotores do crescimento vegetal, em casa de vegetação.

Isolados	Massa seca das raízes (g)	PMFP/PMFT	Eficiência simbiótica	
			Ausência <i>G. clarum</i>	Presença <i>G. clarum</i>
MA2	1,46 B	0,69 A	-2,90 <sup>(1)</sup>	2,03
MA5	1,43 B	0,68 B	-5,16	-2,71
MF1	1,49 A	0,68 B	1,61	-2,03
MF3	1,48 A	0,68 B	0,64	-1,02
Controle	1,49 A	0,68 B	--	--
Valor de F	3,06*	2,86*	--	--
CV (%)	2,36	1,34	--	--

Nota: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey. \*Significativo a 5% pelo teste F. CV (%) = coeficiente de variação. <sup>(1)</sup>Eficiência simbiótica = [(matéria seca de parte aérea da planta inoculada/ matéria seca da parte aérea do controle) -1] X 100.

Fonte: Elaboração do autor.

Visualmente as plantas de mangabeira aclimatizadas em ausência de *G. clarum* tiveram maior crescimento, mas quando inoculadas com MA2 *in vitro* apresentaram maior proporção de folhas expandidas, com menor volume e comprimento de raízes adventícias (Figura 2A). A inoculação com MA5, na ausência de FMA, proporcionou folhas expandidas maiores e menor proporção de suas raízes adventícias, porém com maior comprimento (Figura 2B). As plantas inoculadas *in vitro* com MF1 ou MF3 (Figura 2C e 2D, respectivamente) mostraram folhas expandidas em menor número, raízes com menor volume, porém maior comprimento. As plantas com ausência de inoculação *in vitro* na aclimatização apresentaram folhas expandidas e suas raízes adventícias apresentaram maior volume e menor comprimento (Figura 2E).

Na aclimatização com *G. clarum*, as plantas de mangabeira foram menores. Visualmente, as inoculadas com MA2 *in vitro* tinham folhas expandidas maiores, porém em menor número e com maior volume de raízes adventícias (Figura 2F). As plantas inoculadas com MA5, MF1 e MF3 (Figura 2G, 2H e 2I, respectivamente) continham folhas expandidas menores, entrenós curtos e suas raízes adventícias de maior comprimento, porém com menor volume. As plantas aclimatizadas sem inoculação *in vitro* tinham folhas expandidas grandes com pigmentação avermelhada e suas raízes adventícias eram pequenas, com pouco volume (Figura 2J).

As mudas micropropagadas de mangabeira foram beneficiadas com a inoculação *in vitro* do MF1 e aclimatização com *G. clarum*, tendo maior porcentagem de sobrevivência e

enraizamento, enquanto a ausência do *G. clarum*, na aclimatização, proporcionou maior crescimento das plantas.

### Ensaio II – Inoculação *ex vitro* de fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) em frascos contendo plantas de mangabeira

Os maiores e os menores valores de sobrevivência e enraizamento foram verificados para o tratamento com o MA2 e MA5, sem inoculação com FMA, respectivamente. As plantas responderam a co-inoculação (FPCV com FMA), para ambas as variáveis, quando o isolado foi o MA5, com ganho médio igual ou superior a 100 % ou MF1 para maior porcentagem de sobrevivência. As plantas responderam positivamente a inoculação apenas do FMA (tratamento controle), com acréscimo de 16, 7 e 26,5 % na porcentagem de sobrevivência e enraizamento, respectivamente (Tabela 5).

**Tabela 5-** Porcentagem de sobrevivência e enraizamento de plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas *ex vitro* com fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) em ausência ou presença de *Glomus clarum* na aclimatização, em casa de vegetação.

Isolados	<i>Glomus clarum</i>			
	Ausência		Presença	
	Sobrevivência (%)		Enraizamento (%)	
MA2	60,0 Aa	26,7 Db	60,0 Aa	26,7 Cb
MA5	20,0 Db	53,3 Aa	20,0 Eb	40,0 Aa
MF1	46,7 Bb	53,3 Aa	46,7 Ba	40,0 Ab
MF3	40,0 Ca	33,3 Cb	40,0 Ca	33,3 Bb
Controle	40,0 Cb	46,7 Ba	26,7 Db	33,3 Ba
Valor de F	497,83*		277,78*	
CV (%)	3,17		3,96	

Nota: Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, para cada variável, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey. \*Significativo a 5%. CV (%)= coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração do autor.

O número médio de gemas e entrenós foram maiores com a presença do *G. clarum* na aclimatização (Tabela 6). Tal resultado pode ser relacionado com o fato das plantas inoculadas com FMA exibirem maior crescimento, e conseqüentemente, maior número médio de gemas e entrenós.

**Tabela 6-** Número médio de gemas e entrenós de plantas micropropagadas de mangabeira aclimatizadas em presença ou ausência de *Glomus clarum*, em casa de vegetação.

<i>Glomus clarum</i>	Número médio de gemas	Número médio de entrenós
Ausência	11,33 B	5,53 B
Presença	13,87 A	7,00 A
Valor de F	8,40*	9,68*
CV (%)	19,00	20,60

Nota: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey. \*Significativo a 5%. CV (%)= coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração do autor.

A co-inoculação de *G. clarum* com MA5 e MF1 proporcionou maior sobrevivência e enraizamento das plantas de mangabeira (Tabela 7). Resultados parecidos de co-inoculação foram relatados para plantas de abacaxi durante a aclimatização com uma mistura de FMA (*Claroideoglossum etunicatum*, *Dentiscutata heterogama*, *Rhizophagus clarus*) com *Piriformospora indica*, considerada adequada para produção de alta qualidade (MOREIRA et al., 2015). Martínez-Medina et al. (2011) observaram que a inoculação isolada de FMA não acarretou maior crescimento de plantas de melão, porém a co-inoculação deste com *T. harzianum* promoveu aumento da parte aérea das plantas.

A inoculação isolada do FMA neste trabalho proporcionou maior número médio de folhas e entrenós nas plantas de mangabeira (Tabela 6). Sohn et al. (2003) com a inoculação do FMA *Glomus* sp. encontraram maior porcentagem de enraizamento, comprimento de raízes e número de raízes laterais, comprimento médio de parte aérea, área foliar, massa fresca e seca de parte aérea, caule e raízes de plantas de crisântemo (*Chrysanthemum morifolium*). A inoculação dos FMA *Glomus intraradices*, *G. etunicatum* e *Acaulospora* sp. mostrou efeito positivo no crescimento de plantas de antúrio (*Anthurium andraeanum*) durante a aclimatização (STANCATO; SILVEIRA, 2006) e de *S. heterogama*, *G. etunicatum*, *G. clarum* e *Gigaspora margarita* promoveram maior crescimento de mudas de mirtilheiro (FARIAS et al., 2014).

Entretanto, resultados negativos referentes à inoculação com FMA também têm sido relatado. A inoculação do FMA *G. intraradices* durante a aclimatização de mudas de antúrio não promove o crescimento destas (STANCATO; SILVEIRA, 2010). Mudas de *S. parahyba* var. *amazonicum* inoculadas com *G. clarum* não exibiram maior crescimento, porém a mortalidade diminuiu durante períodos de estresse (GONÇALVES et al., 2015). Da mesma forma, não ocorre incremento na biomassa de plantas de abacaxi quando inoculadas com FMA *R. clarus* (KUNZE et al., 2014).

Alguns autores descrevem que a utilização do FMA na aclimatização de mudas micropropagadas proporciona aumento do vigor e capacidade de sobrevivência das plantas pela maior absorção de nutrientes, aumenta a tolerância a patógenos radiculares, reduz o tempo de aclimatização e proporciona maior homogeneidade das plantas quanto ao crescimento ou quanto à resposta a nutrientes (LOCATELLI; LOVATO, 2002; MARTÍNEZ-MEDINA et al., 2011; MOREIRA et al., 2015). Algumas destas respostas foram observadas neste trabalho nas mudas de mangabeira (Tabelas 5 e 6).

Para número médio de folhas em plantas micropropagadas de mangabeira, os maiores valores foram detectados com a inoculação *ex vitro* do isolado MF3 (Tabela 7). Maior eficiência simbiótica foi verificada com a inoculação *ex vitro* do isolados MA2 e MF1, na ausência de *G. clarum*, enquanto que na presença do FMA maiores valores foram obtidos com a inoculação de MA2 e MF3.

**Tabela 7-** Número médio de folhas e eficiência simbiótica de plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas *ex vitro* com fungos promotores do crescimento vegetal na aclimatização, em casa de vegetação.

Isolados	Número médio de folhas	Eficiência simbiótica	
		Ausência <i>Glomus clarum</i>	Presença <i>Glomus clarum</i>
MA2	4,17 AB	0,33	1,34
MA5	3,17 B	-2,67	-0,67
MF1	4,67 AB	1,67	0,00
MF3	6,33 A	0,00	1,68
Controle	5,50 AB	--	--
Valor de F	4,30*	--	--
CV (%)	30,16	--	--

Nota: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey. \*Significativo a 5%. CV (%)= coeficiente de variação. <sup>(1)</sup>Eficiência simbiótica = [(matéria seca de parte aérea da planta inoculada/ matéria seca da parte aérea do controle) -1] X 100.

Fonte: Elaboração do autor.

A inoculação dos isolados fúngicos promoveram o enraizamento das plantas de mangabeira, com destaque para o MA2 (Tabela 5). Todos os microrganismos utilizados neste trabalho sintetizam ácido índole acético (AIA), o que pode ter beneficiado as plantas micropropagadas, visto que todas foram aclimatizadas sem raiz. A presença deste fitormônio promove o crescimento das raízes e proliferação de pelos radiculares, melhorando a absorção de nutrientes e água do solo e, com isso, o crescimento das plantas (OLIVEIRA et al., 2012). Outros autores também observaram incremento no crescimento de diferentes espécies vegetais,

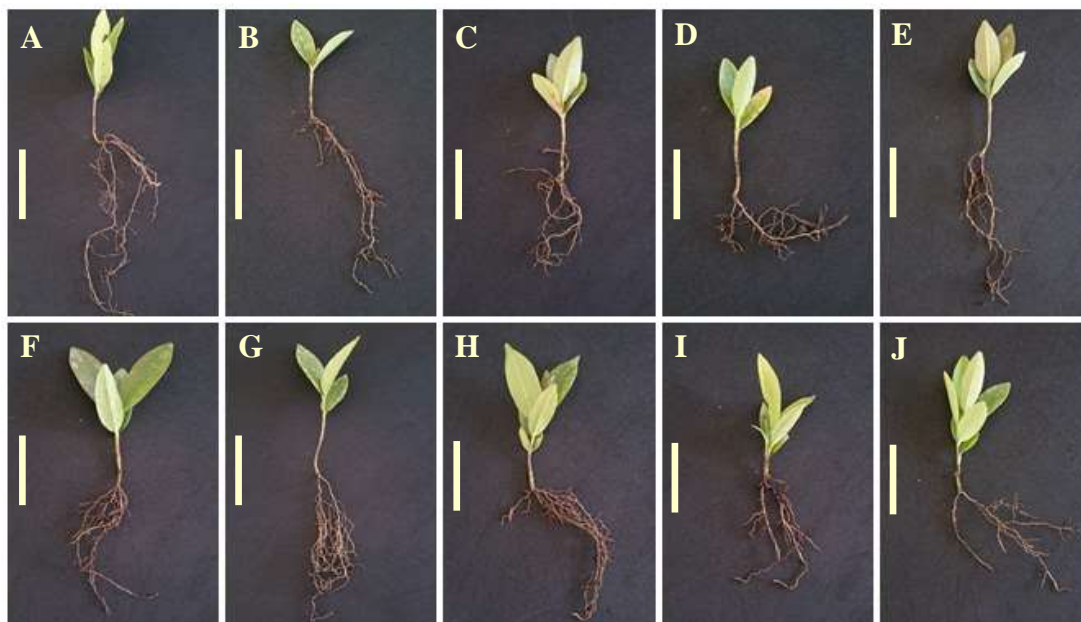
quando estas foram inoculadas com FPCV. Microestacas de *Eucalyptus* sp. inoculadas com isolados de *Trichoderma* spp. mostraram maior sobrevivência e enraizamento (FORTES et al., 2007). Maior comprimento médio de raízes, massa fresca de raiz de plantas de pepino foram verificados após a inoculação com *Trichoderma asperellum* Q1 (LEI; Ya-q, 2015). Gravel, Antoun e Tweddell (2007) relataram aumento do peso fresco de parte aérea e raízes de plantas de tomate inoculadas com *Trichoderma atroviride*.

A inoculação com bactérias também tem mostrado ser benéfica para as plantas, como pode ser observado com a inoculação de *Azospirillum brasilense*, *Bacillus megaterium* e *Klebsiella pneumoniae* em mudas de tamareira (*Phoenix dactylifera* L.), com aumento no crescimento e sobrevivência das mudas (FARRAG; ABEER; DARWESH, 2011). Durante a aclimatização de três frutíferas (ameixa Mr.S 2/5 (*Prunus cerasifera* x *P. spinosa*), híbrido GF 677 (*Prunus persica* x *P. amygdalus*) e maçã MM 106 (NorthenSpy x M1) a inoculação de *A. brasilense* Sp245 promoveu maior crescimento das mudas (VETTORI et al., 2010). A inoculação de plantas de gengibre vermelho (*Alpinia purpurata* Vieill) durante a aclimatização com *Azospirillum* sp. e *Azotobacter* sp. aumentou a taxa de sobrevivência, diâmetro de caule, massa seca de raiz e número de brotações das plantas (OVANDO-MEDINA et al., 2007).

A ausência do *G. clarum* na aclimatização proporcionou menor crescimento das plantas de mangabeira. As plantas inoculadas *ex vitro* com MA2 tiveram maior número de folhas e suas raízes tinham menor volume, porém maior comprimento (Figura 3A). As plantas inoculadas com MA5 exibiram menor número de folhas e volume de raízes adventícias, mas o maior comprimento médio destas (Figura 3B). A inoculação de MF1 (Figura 3C) e MF3 (Figura 3D) proporcionou menor número de folhas, volume e comprimento de raízes. As plantas sem inoculação de FPCV exibiram folhas expandidas maiores, mas com pigmentação avermelhada e menor volume de raízes (Figura 3E).

As plantas de mangabeira aclimatizadas com *G. clarum* mostraram maior crescimento. Visualmente, a inoculação *ex vitro* de MA2 proporcionou folhas expandidas maiores nas plantas de mangabeira com menor volume de raízes adventícias (Figura 3F). As plantas inoculadas com MA5 tiveram menor número de folhas, sendo estas de menor tamanho (Figura 3G). Folhas expandidas foram maiores com a inoculação de MF1 (Figura 3H). A inoculação *ex vitro* de MF3 (Figura 3I) e ausência de inoculação de FPCV (Figura 3J) acarretou folhas de menor expansão na plantas e volume de raízes adventícias.

**Figura 3-** Plantas micropropagadas de mangabeira aclimatizadas com fungos promotores do crescimento vegetal e *Glomus clarum*, em casa de vegetação. Ausência de *Glomus clarum*: MA2 (A); MA5 (B); MF1 (C); MF3 (D) e sem inoculação (E). Presença de *Glomus clarum*: MA2 (F); MA5 (G); MF1 (H); MF3 (I) e *Glomus clarum* (J). Barra= 10 mm.



Fonte: Elaboração do autor.

A inoculação *ex vitro* de MA2 sem *G. clarum* proporcionou maior porcentagem de sobrevivência e enraizamento de mudas micropropagadas de mangabeira. No entanto, altas taxas de sobrevivência e enraizamento também foram verificadas com a inoculação *ex vitro* de MA5 e MF1 com *G. clarum*, além do FMA ter proporcionado maior número médio de gemas e entrenós.

#### 4 CONCLUSÕES

Maior sobrevivência e enraizamento das plantas de mangabeira ocorreram com a inoculação *in vitro* do isolado fúngico MF1 e com *G. clarum* na aclimatização das plantas. A inoculação de MF1 *in vitro* proporcionou maior comprimento médio, peso da massa fresca da parte aérea e massa seca das raízes.

Alta taxa de sobrevivência e enraizamento na aclimatização de plantas de mangabeira foi verificada com a inoculação *ex vitro* de MA2. A inoculação de *G. clarum* proporciona maior número médio de gemas e entrenós em plantas aclimatizadas de mangabeira.

## REFERÊNCIAS

- BARROS, D. I.; BRUNO, R de L. A.; NUNES, H. V.; MENDONÇA, R. M. N.; PEREIRA, W. E. Comportamento fisiológico de sementes de mangaba submetidas à dessecação. **Revista Acta Tecnológica**, São Luís, v. 5, n.1, p. 31-43, 2010.
- CAVALCANTE, U. M. T.; GOTO, B. T.; MAIA, L. C. Aspectos da simbiose micorrízica arbuscular. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 5, p. 180-208, 2008-2009.
- COSTA, C. M. C.; CAVALCANTE, U. M. T.; GOTO, B. T.; SANTOS, V. F. dos; MAIA, L. C. Fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada em mudas de mangabeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 3, p. 225-232, 2005.
- ENDRINGER, D. C.; PEZZUTO, J. M.; BRAGA, F. C. NF-kB inhibitory activity of cyclitols isolated from *Hancornia speciosa*. **Phytomedicine**, Jena, v. 16, n. 11, p. 1064-1069, 2009.
- FARIAS, D. H.; PINTO, M. A. B.; CARRA, B.; SCHUCH, M. W.; SOUZA, P. V. D. Desenvolvimento de mudas de mirtilheiro inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 3, p. 655-663, 2014.
- FARRAG, H. M.; ABEER, H. E.; DARWESH, R. S. Growth promotion of date palm plantlets *ex vitro* by inoculation of rizosphere bacteria. **Journal of Horticultural Science and Ornamental Plants**, Dubai, v. 3, n. 2, p. 130-136, 2011.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FORTES, F. O.; SILVA, A. C. F.; ALMANÇA, M. A. K.; TEDESCO, S. B. Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 2, p. 221-228, 2007.
- GONÇALVES, P. J. R. O.; OLIVEIRA, A. G.; FREITAS, V. F.; CHIARI, N. A.; NAVARRO, M. P.; CELY, M. T.; LEAL, A. C.; ANDRADE, G. Plant growth-promoting microbial inoculant for *Schizolobium parahyba* pv. *parahyba*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 39, n. 4, p. 663-670, 2015.
- GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R. J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, n. 8, p. 1968-1977, 2007.
- KUNZE, A.; LOVATO, P. E.; COSTA, M. D.; VESCO, L. L. D. Pineapple (*Ananas comosus*) cv. Pérola *ex vitro* growth and mycorrhizal colonization affected by *in vitro* sucrose concentration. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 3, p. 766-770, 2014.
- LEI, Z.; YA-qing, Z. Effects of phosphate solubilization and phytohormone production *Trichoderma asperellum* Q1 on promoting cucumber growth under salt stress. **Journal of Integrative Agriculture**, Beijing, v. 14, n. 8, p. 1588-1597, 2015.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Carlisle, v. 30, p. 421-327, 1980.

LOCATELLI, L. M.; LOVATO, P. E. Inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta-enxertos de macieira micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 177-184, 2002.

MARIANO, R. de L. R.; SILVEIRA, E. B. da; ASSIS, S. M. P. de; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma**, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.

MARTÍNEZ-MEDINA, A.; ROLDÁN, A.; ALBACETE, A.; PASCUAL, J. A. The interaction with arbuscular mycorrhizal fungi or *Trichoderma harzianum* alters the shoot hormonal profile in melon plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 72, n. 2, p. 223-229, 2011.

MOREIRA, B. C.; MENDEES, F. C.; MENDES, I. R.; PAULA, T. A.; PRATES JUNIOR, P.; SALOMÃO, L. C. C.; STURMER, S. L.; OTONI, W. C.; GUARÇONI, A. M.; KASUYA, M. C. M. The interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Piriformospora indica* improves the growth and nutrient uptake in micropropagation-derived pineapple plantlets. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 197, p. 183-192, 2015.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 15, p 473-479, 1962.

OLIVEIRA, A. G.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; SANTOS, G. R.; MILLER, L. O.; CHAGAS, L. F. B. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 7, n. 3, p. 149-155, 2012.

OLIVEIRA, J. R. G. de; MORAES, M. T. A. de L.; MELO, N. F. de; MELO, A. M. Y. Fungos micorrízicos arbusculares e rizobactérias promotoras de crescimento na aclimatização de *Zingiber spectabile*. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 3, p687-694, 2010.

OVANDO-MEDINA, I.; ADRIANO-ANAYA, L.; CHAVEZ-AGUILAR, A.; OLIVALLAVEN, A.; AYORA-TALAVERA, T.; DENDOOVEN, L.; GUTIÉRREZ-MICELI, F.; SALVADOR-FIGUEROA, M. *Ex vitro* survival and early growth of *Alpinia purpurata* plantlets inoculated with *Azotobacter* and *Azospirillum*. **Pakistan Journal Biological Sciences**, Dubai, v. 10, n. 19, p. 3454-3457, 2007.

PINHEIRO, M. S. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citoprotetora gástrica dos extratos de Mangaba, Caju e Própolis Vermelha**. 2009. 71 f. Dissertação (mestrado em Saúde e Ambiente) - Instituto de saúde e ambiente - Universidade Tiradentes. Aracaju, 2009.

RODRÍGUEZ-ROMERO, A. S.; GUERRA, M. S.; JAIZME-VEJA, M. C. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobacteria on banana growth and nutrition. **Agronomy for Sustainable Development**, Les Ulis Cedex A, v. 25, n. 3, p. 395-399, 2005.

- SANTOS, A F. dos; SILVA, S. de M.; MENDONÇA, R. M. N.; ALVES, R. E. Conservação pós-colheita de mangaba em função da maturação, atmosfera e temperatura de armazenamento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 85-91, 2009.
- SANTOS, M. H. L. C.; MARIANO, R. de L. R.; CAMARA, T. R.; ANDRADE, A. G. de; WILLADINO, L.; LIMA, G. P. P. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. **Hoehnea**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 2-8, 2005.
- SANTOS, P. C. G. dos; ALVES, E. U.; GUEDES, R. S.; SILVA, K. B.; CARDOSO, E. de A.; LIMA, C. R. de. Qualidade de sementes de *Hancornia speciosa* Gomes em função do tempo de secagem. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 343-352, 2010.
- SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A. de; NOGUEIRA, R. C.; EMRICH, E. C.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes de caulinares de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, 2007.
- SOHN, B. K.; KIM, K. Y.; CHUNG, S. J.; KIM, W. S.; PARK, S. M.; KANG, J. G.; RIM, Y. S.; CHO, J. S.; KIM, T. H.; LEE, J. H. Effect of the different timing of AMF inoculation on plant growth and flower quality of chrysanthemum. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 173-183, 2003.
- STANCATO, G. C.; SILVEIRA, A. P. D. Associação de fungos micorrízicos arbusculares e cultivares micropropagadas de antúrio. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 3, p. 511-516, 2006.
- STANCATO, G. C.; SILVEIRA, A. P. D. Micorrização e adubação de mudas micropropagadas de antúrio, cv. Eidibel: crescimento e aclimatização *ex vitro*. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 4, p. 957-963, 2010.
- VÁSQUEZ, M. M.; CÉSAR, S.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, n. 3, 2000.
- VESTBERG, M.; KUKKONEN, S.; SAARI, K.; PARIKKA, P.; HUTTUNEN, J.; TAINIO, L.; DEVOS, N.; WEEKERS, F.; KEVERS, C.; THONART, P.; LEMOINE, M. C.; CORDIER, C.; ALABOUVETTE, C.; GIANINAZZI, S. Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 27, n. 3, p. 243-258, 2004.
- VETTORI, L.; RUSSO, A.; FELICI, C.; FIASCHI, G.; MORINI, S.; TOFFANIN, A. Improving micropropagation: Effect of *Azospirillum brasilense* sp245 on acclimatization of rootstocks of fruit tree. **Journal of Plant Interactions**, London, v. 5, n. 4, p. 249-259, 2010.
- VIEIRA, R. F.; COSTA, T. S. A.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. **Frutas nativas da Região Centro-Oeste**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2006. 320 p.

WEBER, O. B.; CORREIA, D.; ROCHA, M. W.; ALVEZ, G. C.; OLIVEIRA, E. M.; SÁ, E. G. Resposta de plantas micropropagadas de abacaxizeiro à inoculação de bactérias diazotróficas em casa de vegetação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 12, p. 1419-1426, 2003.

## CAPÍTULO 5

### ÉPOCA E MÉTODO DE INOCULAÇÃO DE FUNGOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM PLANTAS MICROPROPAGADAS DE MANGABEIRA NA ACLIMATIZAÇÃO

**RESUMO:** A micropropagação utilizando técnicas de cultura de tecidos é a alternativa para a obtenção de grande número de mudas uniformes, independente da época do ano, e importante na propagação de plantas com baixa taxa de germinação, como a mangabeira. Microrganismos promotores de crescimento têm sido recomendados durante a aclimatização, por estimular o enraizamento durante esta etapa e aumentar a tolerância aos estresses bióticos e abióticos. Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da época e métodos de inoculação de fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) na presença e ausência do fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Glomus clarum*, na aclimatização de mudas micropropagadas de mangabeira. No ensaio (I), estas foram aclimatizadas em substrato Bioplant® e submetidas a quatro tratamentos de inoculação (FMA, FPCV, FMA + FPCV e controle), em cinco épocas de inoculação dos FPCV (0, 5, 10, 15 e 20 dias) após a aclimatização. As plantas no ensaio (II) foram aclimatizadas em substrato Bioplant® e submetidas a cinco tratamentos de inoculação dos FPCV: próximo ao colo da planta (I), pulverização das plantas (P), I + P, P + P após 24 h e controle, em presença ou ausência de *G. clarum*. O inóculo com FPCV foi preparado com 4 isolados cultivados separadamente. Maior porcentagem de sobrevivência, enraizamento e crescimento das plantas micropropagadas de mangabeira foi obtida com a inoculação de FPCV aos 20 dias após a aclimatização. A pulverização das plantas com FPCV, em presença de *G. clarum*, foi o que proporcionou maior sobrevivência e enraizamento das mudas, enquanto, a inoculação de *G. clarum* proporcionou maiores relações peso da massa fresca da parte aérea/peso da massa fresca total e peso da massa seca da parte aérea/peso da massa seca total das mudas micropropagadas de mangabeira durante a aclimatização.

**Palavras-chave:** *Hancornia speciosa* Gomes. Cerrado. Micropropagação. Fungo micorrízico arbuscular. Fitormônio. Solubilizador de fosfato.

## 1 INTRODUÇÃO

Para formação de mudas, plantas micropropagadas devem ser submetidas à etapa final da micropropagação, que é a aclimatização, onde ocorre a transferência *in vitro* para *ex vitro* (STANCATO; SILVEIRA, 2010). Essas são mais uniformes e mostram sincronia de floração e frutificação no campo. A micropropagação proporciona produção de alta qualidade e em larga escala, em qualquer época do ano, de culturas livres de patógenos, além de garantir grande número de plantas geneticamente idênticas a planta mãe (MOREIRA et al., 2015; VESTBERG et al., 2004).

A utilização de microrganismos que promovem o crescimento das plantas durante a fase de aclimatização tem sido recomendada, entre outros, para estímulo do enraizamento *ex vitro*, aumento da tolerância a estresses bióticos e abióticos, promoção de crescimento, aumento da área foliar, número de folhas, matéria seca, redução do tempo de aclimatização, aumento da resistência aos patógenos e sobrevivência das mudas após o transplante (MARIANO et al., 2004; SANTOS et al., 2005).

Estes beneficiam as plantas por meio de mecanismos diretos, como fixação de nitrogênio, produção de fitormônios, redução dos níveis de etileno no solo, solubilização de fosfato e secreção de sideróforos. As formas indiretas incluem mecanismos de biocontrole, produção de antibióticos, indução de resistência sistêmica, entre outros, sendo que microrganismos que possuem diversas características podem ser utilizados como inoculantes microbianos na agricultura (AGUADO-SANTACRUZ et al., 2012; MOREIRA; ARAÚJO, 2013; OLIVEIRA et al., 2012; RAHI et al., 2009).

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) se destaca como uma das mais promissoras frutíferas para programas de exploração sustentável. A incorporação da espécie em sistemas de horticultura tem sido proposta como um meio para contribuir para a sua conservação e, também, reduzir a pobreza em áreas em que esta frutífera é nativa e cresce satisfatoriamente (COSTA et al., 2005; SANTOS et al., 2010; SOARES et al., 2007a; 2009;). Ela contém uma polpa branca, agridoce e aromática, sendo 80 % da polpa aproveitada na forma de sucos, sorvetes, licores, doces, vinho e vinagre ou consumida *in natura* (COSTA et al., 2005; SANTOS et al., 2010). Por ser uma planta laticífera, a presença do látex nos frutos é uma vantagem para a preparação de sorvetes e geléias (SAMPAIO; NOGUEIRA, 2006; SOARES et al., 2007a).

A falta de informações sobre essa cultura vem restringindo seu cultivo comercial, tornando o seu aproveitamento limitado a pequenos produtores e à exploração extrativista (COSTA et al., 2005). Sua propagação pela via sexuada é dificultada pelo elevado grau de

recalcitrância de suas sementes e pelo mesocarpo ação inibitória sobre a germinação. Suas mudas têm um crescimento lento, o que é comum em árvores do cerrado. Estas características reduzem o interesse na propagação convencional da mangaba e outras árvores frutíferas (CALDAS et al., 2009; SOARES et al., 2007b; SOARES et al., 2009).

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da época e métodos de inoculação de fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) na presença e ausência do fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Glomus clarum*, na aclimatização de mudas micropropagadas de mangabeira.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 COLETA E DESPOLPA DE FRUTOS DE MANGABEIRA

Os frutos foram coletados de diferentes plantas de mangabeira na Fazenda Gameleira, município de Montes Claros de Goiás - GO. A despolpa foi realizada manualmente, com auxílio de peneira de alumínio malha n°55. As sementes foram lavadas em água corrente, para retirar o excesso de mesocarpo aderido para, em seguida, serem imersas por 1 minuto em álcool 70 % (v/v) e 30 min em solução de cloro ativo (1 %). O triplo enxágue foi feito em câmara de fluxo laminar com água destilada e autoclavada.

### 2.2 ESTABELECIMENTO DE SEMENTES E MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE EXPLANTES DE MANGABEIRA

As sementes foram transferidas, uma a uma, para tubo de ensaio (25 x 150 mm) contendo 20 mL de meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) modificado para a metade da concentração original dos sais (MS ½), mais vitaminas, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 3,5 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,03 antes da autoclavagem. Os tubos de ensaios com as sementes foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 h, temperatura de 25 ± 3°C, umidade relativa de 45 a 46 % e radiação fotossintética ativa de 45-55 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Para a fase de multiplicação *in vitro*, os explantes de mangabeira foram transferidos para tubos de ensaio contendo 20 mL de meio de cultivo WPM (LLOYD; MCCOW, 1980), modificado para a metade da concentração original dos sais (WPM ½), mais vitaminas, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 3,5 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,03 antes da autoclavagem. Após a inoculação, os tubos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento.

### 2.3 PRÉ-ACCLIMATIZAÇÃO

As plantas de mangabeira foram transferidas para frascos (12 x 5 cm) contendo 25 mL de meio de cultivo WPM ½, mais vitaminas, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 3,5 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,03 antes da autoclavagem. Cada frasco tinha cinco plantas e foram mantidos em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 h, temperatura de 23 ± 3 °C, umidade relativa de 45 a 46 % e radiação fotossintética ativa de 45-55 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>,

Após 20 dias, os frascos foram transferidos para armário com radiação fotossintética ativa de  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sob fotoperíodo de 16 h, temperatura de  $27 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$  e umidade relativa de 48 a 50 %. As tampas de polipropileno dos frascos foram destravadas, posteriormente deixadas semi-abertas para, em seguida, serem retiradas, tendo 24 h entre cada etapa.

### **Ensaio I – Época de inoculação de FPCV em mudas aclimatizadas de mangabeira, na presença ou ausência do FMA *Glomus clarum***

Como inoculante foram utilizados uma mistura de quatro FPCV (MA2, MA5, MF1 e MF3), isolados de solo próximo a raízes de plantas de mangabeira, conforme descrito por Cabral (2012) e mantidos em tubos de ensaio contendo meio de cultura GL (glicose 10 g; extrato de levedura 2 g e ágar 15 g), em refrigerador a  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Cada isolado foi cultivado separadamente, em erlenmeyer de 125 mL contendo meio líquido GL (extrato de levedura 2 g e glicose 10 g) e incubados a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  por 72 h. Os inoculantes foram padronizados para  $10^8$  ufc (unidade formadora de colônia)  $\text{mL}^{-1}$  utilizando câmara de Neubauer e, posteriormente, misturados na relação 1:1 (v:v) no momento da inoculação das mudas.

O inoculante micorrízico foi constituído por *G. clarum*, procedente da coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo da UFLA – Universidade Federal de Lavras, e doada à UNESP- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia, Campus de Ilha Solteira.

### **Aclimatização e inoculação**

As plantas de mangabeira foram aclimatizadas em substrato Bioplant<sup>®</sup> e submetidas a quatro tratamentos de inoculação: FMA, FPCV, FMA + FPCV e controle não inoculado, em cinco épocas de inoculação dos FPCV (0, 5, 10, 15 e 20 dias) após a aclimatização. Todos os vasos foram envoltos com saco plástico de 1 L.

As plantas que receberam *G. clarum* foram inoculadas no orifício de transplante com 3,3 g de inoculo ( $10$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  de solo). Para a inoculação do FPCV foi adicionado 15 mL de inoculante líquido da mistura destes a  $10^8$  ufc  $\text{mL}^{-1}$  no colo de cada planta, em cada época de inoculação.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 4 x 5 (quatro tratamentos de inoculação x cinco tempos de inoculação), com 20 repetições por tratamento, cada uma constituída por um vaso com uma planta. Os dados numéricos foram avaliados

estatisticamente, mediante a análise de variância e as médias, analisadas por regressão, com o auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2011).

## **Ensaio II – Métodos de inoculação de FPCV em mudas aclimatizadas de mangabeira, na presença ou ausência do FMA *Glomus clarum***

Foram utilizados quatro isolados FPCV (MA2, MA5, MF1 e MF3) obtidos de solo próximo a raízes de plantas de mangabeira, conforme descrito por Cabral (2012) e mantidos em tubos de ensaio contendo meio de cultura GL (glicose 10 g; extrato de levedura 2 g e ágar 15 g), em refrigerador a 5 °C. O inoculante foi composto da mistura dos quatro isolados de FPCV, e preparado como anteriormente descrito.

### **Aclimatização e inoculação**

As plantas de mangabeira foram aclimatizadas em substrato Bioplant® e submetidas a cinco tratamentos de inoculação de FPCV: inoculação próximo ao colo da planta (I), pulverização das plantas (P), I + P, P + P após 24 h e controle não inoculado, em presença ou ausência de *G. clarum*. Após todos os vasos foram envoltos com saco plástico de 1 L.

As plantas que receberam *G. clarum* foram inoculadas no orifício de transplantio com 3,3 g de inóculo de FMA (10 esporos mL<sup>-1</sup> de solo). Para a inoculação próxima ao colo da planta com FPCV foi adicionado 15 mL de inoculante líquido obtido da mistura dos isolados fúngicos a 10<sup>8</sup> ufc mL<sup>-1</sup> e para as pulverizações das plantas foi utilizado mini pulverizador, onde para cada planta foi utilizado 15 mL do inoculante líquido, anteriormente preparado.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 5 x 2 (métodos de inoculação de FPCV x ausência ou presença de FMA), com 20 repetições por tratamento, cada uma constituída por um vaso contendo uma planta. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando as médias pelo teste de Tukey (5%), utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2011).

Em ambos ensaios (I e II), os vasos foram mantidos em casa de vegetação com temperatura de 35 ± 3 °C, umidade relativa de 20 a 25 % e sombreamento de 50 %. A irrigação foi manual, ocorrendo três dias na semana com volume de 15 mL por vaso. A cada duas semanas, a irrigação foi realizada com solução nutritiva em todos os tratamentos, composta pelos sais do meio WPM ½ (Tabela 1), no volume de 15 mL por vaso.

**Tabela 1-** Sais do meio de cultivo WPM ½ utilizados para preparo da solução nutritiva.

<b>Solução</b>	<b>Componentes</b>	<b>Concentração na solução estoque (p/ 1 litro)</b>	<b>Volume para 1 litro</b>
A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ;	10,00 g L <sup>-1</sup>	20 mL
	Ca[NO <sub>3</sub> ].4H <sub>2</sub> O	13,90 g L <sup>-1</sup>	
B	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	24,75 g L <sup>-1</sup>	20 mL
C	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,40 g L <sup>-1</sup>	20 mL
D	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ;	17,00 g L <sup>-1</sup>	5 mL
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ;	0,65 g L <sup>-1</sup>	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25 g L <sup>-1</sup>	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O;	37,00 g L <sup>-1</sup>	
E	MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O;	2,23 g L <sup>-1</sup>	5 mL
	ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O;	0,86 g L <sup>-1</sup>	
	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,025 g L <sup>-1</sup>	
F	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,78 g L <sup>-1</sup>	5 mL
	Na <sub>2</sub> .EDTA	3,72 g L <sup>-1</sup>	

Fonte: Elaboração do autor.

A cada sete dias foi realizado um furo neste, até chegar a sua abertura plena, totalizando 4 furos. Após 30 dias os copos, sacos plásticos e o sombreamento foram retirados e passou a ser utilizada irrigação automática todos os dias e solução nutritiva, a cada duas semanas, no volume de 15 mL.

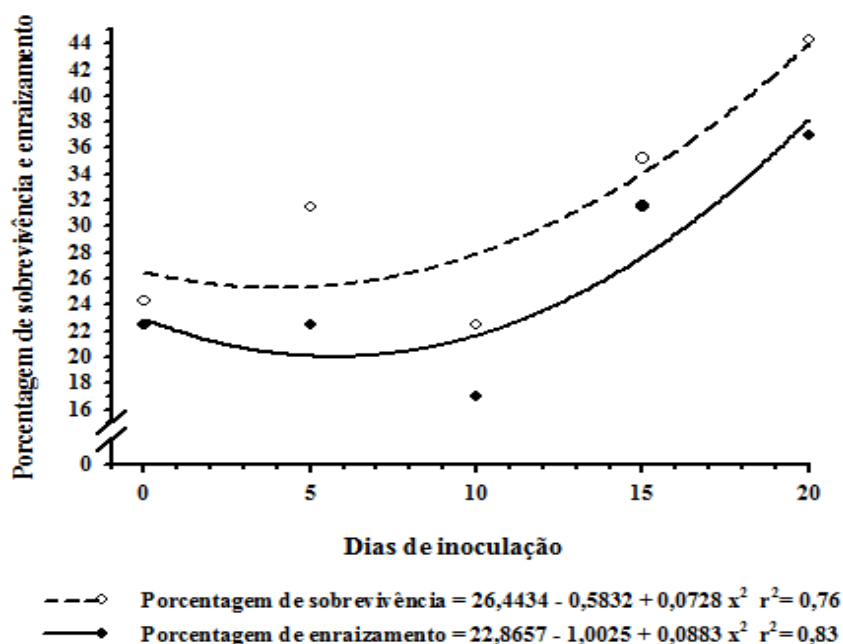
Ao final de 120 dias foi avaliado porcentagem de sobrevivência, enraizamento, comprimento médio da parte aérea, maior raiz, número médio de folhas, gemas, entrenós, diâmetro médio de caule, volume de raiz, peso da massa fresca e seca das folhas, caule, raiz, parte aérea, total da planta, relação peso da massa fresca da parte aérea/peso da massa fresca total (PMFP/PMFT), peso da massa seca da parte aérea/peso da massa seca total (PMSP/PMST), peso da massa fresca das raízes/peso da massa fresca da parte aérea (PMFR/PMFP) e peso da massa seca das raízes/ peso da massa seca da parte aérea (PMSR/PMSP), área foliar e razão da área foliar.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Ensaio I – Época de inoculação de FPCV em mudas aclimatizadas de mangabeira, na presença ou ausência do FMA *Glomus clarum*

Foi observado efeito de dias de inoculação de FPCV sobre as mudas micropropagadas, mostrando comportamento quadrático ascendente, com as maiores porcentagens de sobrevivência e enraizamento verificadas para a inoculação aos 20 dias após a aclimatização (Figura 1).

**Figura 1-** Porcentagem de sobrevivência e enraizamento de plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas com fungos promotores do crescimento vegetal em diferentes dias após a aclimatização, em casa de vegetação.



Fonte: Elaboração do autor.

A inoculação de FPCV acarretou maior comprimento médio de maior raiz, área foliar e razão da área foliar das plantas aclimatizadas de mangabeira, enquanto a inoculação de FMA, FPCV e FMA + FPCV promoveram maior peso da massa fresca e seca das raízes (Tabela 2).

**Tabela 2-** Comprimento médio da maior raiz, área e razão da área foliar, peso da massa fresca e seca das raízes de plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas com fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e *Glomus clarum* na aclimatização, em casa de vegetação.

Tratamentos	Comprimento médio da maior raiz (cm)	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Razão da área foliar (cm <sup>2</sup> . mg <sup>-1</sup> )	Massa fresca das raízes (g)	Massa seca das raízes (g)
FMA	3,50 C	1,12 B	0,25 B	1,51 A	1,49 A
FPCV	9,67 A	2,47 A	0,56 A	1,51 A	1,48 A
FMA+FPCV	7,32 B	1,27 B	0,30 B	1,47 A	1,41 A
Controle	2,83 C	0,57 B	0,15 B	1,01 B	0,99 B
Valor de F	19,55*	6,01*	5,17*	3,58*	3,52*
CV (%)	45,39	91,44	89,91	35,11	35,18

Nota: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey. \*Significativo a 5%. C.V (%)= coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração do autor.

Os menores pesos da massa seca das folhas, de caule e da parte aérea foram verificados no tratamento FPCV+FMA, enquanto os tratamentos FPCV e FMA + FPCV mostraram maior volume de raiz (Tabela 3).

**Tabela 3-** Peso da massa seca das folhas, caule, parte aérea e volume de raiz de plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas com fungos promotores do crescimento vegetal (FPCV) e *Glomus clarum* na aclimatização, em casa de vegetação.

Tratamentos	Massa seca das folhas (g)	Massa seca do caule (g)	Massa seca da parte aérea (g)	Volume de raiz (mL)
FMA	1,49 AB	1,48 A	2,98 A	0,05 B
FPCV	1,50 AB	1,47 A	2,96 A	0,27 A
FMA+FPCV	1,44 B	1,43 B	2,87 B	0,22 A
Controle	1,54 A	1,49 A	3,03 A	0,07 B
Valor de F	3,13*	3,43*	4,07*	2,75*
CV (%)	5,82	4,00	4,37	147,58

Nota: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey. \*Significativo a 5%. C.V (%)= coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração do autor.

Para as relações PMFP/PMFT e PMSP/PMST das plantas de mangabeira, os maiores valores foram verificados na ausência da inoculação dos FPCV (controle). As inoculações de FMA, FPCV e FMA + FPCV proporcionaram os PMFR/PMFP e PMSR/PMSP (Tabela 4).

**Tabela 4-** Relação peso da massa fresca da parte aérea/peso da massa fresca total (PMFP/PMFT), peso da massa seca da parte aérea/peso da massa seca total (PMSP/PMST), peso da massa fresca das raízes/peso da massa fresca da parte aérea (PMFR/PMFP) e peso da massa seca das raízes/peso da massa seca da parte aérea (PMSR/PMSP) de plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas com fungos promotores do crescimento vegetal e *Glomus clarum* na aclimatização, em casa de vegetação.

Tratamentos	PMFP/PMFT	PMSP/PMST	PMFR/PMFP	PMSR/PMSP
FMA	0,67 B	0,67 B	0,49 A	0,50 A
FPCV	0,68 B	0,66 B	0,47 A	0,50 A
FMA + FPCV	0,68 B	0,67 B	0,47 A	0,49 A
Controle	0,79 A	0,78 A	0,29 B	0,32 B
Valor de F	5,41*	4,54*	5,82*	4,69*
CV (%)	13,58	14,5	33,09	33,6

Nota: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey. \*Significativo a 5%. CV (%) = coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração do autor.

A inoculação do *G. clarum*, tanto isoladamente quanto em co-inoculação, foi pouco benéfica para mudas micropropagadas de mangabeira na aclimatização (Tabelas 2, 3 e 4), apesar de seu uso ser recomendado nesta fase, exatamente para maior sobrevivência e crescimento de algumas espécies frutíferas micropropagadas (CAVALCANTE; GOTO; MAIA, 2009; STANCATO; SILVEIRA, 2010). Resultado parecido foi verificado com a inoculação de *G. clarum* em mudas de *S. parahyba* var. *amazonicum* (GONÇALVES et al., 2015).

No presente trabalho, a inoculação do FMA ocorreu apenas no início da aclimatização, sendo esta a melhor época para a inoculação destes em muitas espécies de plantas micropropagadas, por ser quando as plantas têm apenas primórdios radiculares. Algumas plantas se desenvolvem melhor quando a inoculação ocorre após a aclimatização (LOCATELLI; LOVATO, 2002). É de fundamental importância que a associação micorrízica seja estabelecida em curto período de tempo, de forma que os benefícios oriundos da simbiose dependem da combinação específica entre o isolado fúngico e a variedade (LOCATELLI; LOVATO, 2002; ANZANELLO; SOUZA; CASAMALI, 2011), o que pode não ter ocorrido com a inoculação das plantas de mangabeira com *G. clarum*.

A inoculação de FPCV promoveu maior crescimento das mudas micropropagadas durante a fase de aclimatização, reduzindo o estresse das plantas causado pela mudança de ambiente *in vitro* para *ex vitro*. Assim, a utilização de inoculantes compostos por mistura de

microrganismos propiciou maior competição destes com microrganismos nativos do solo, além de promover uma maior colonização e estabelecimento no novo ambiente (MITTAL et al., 2008).

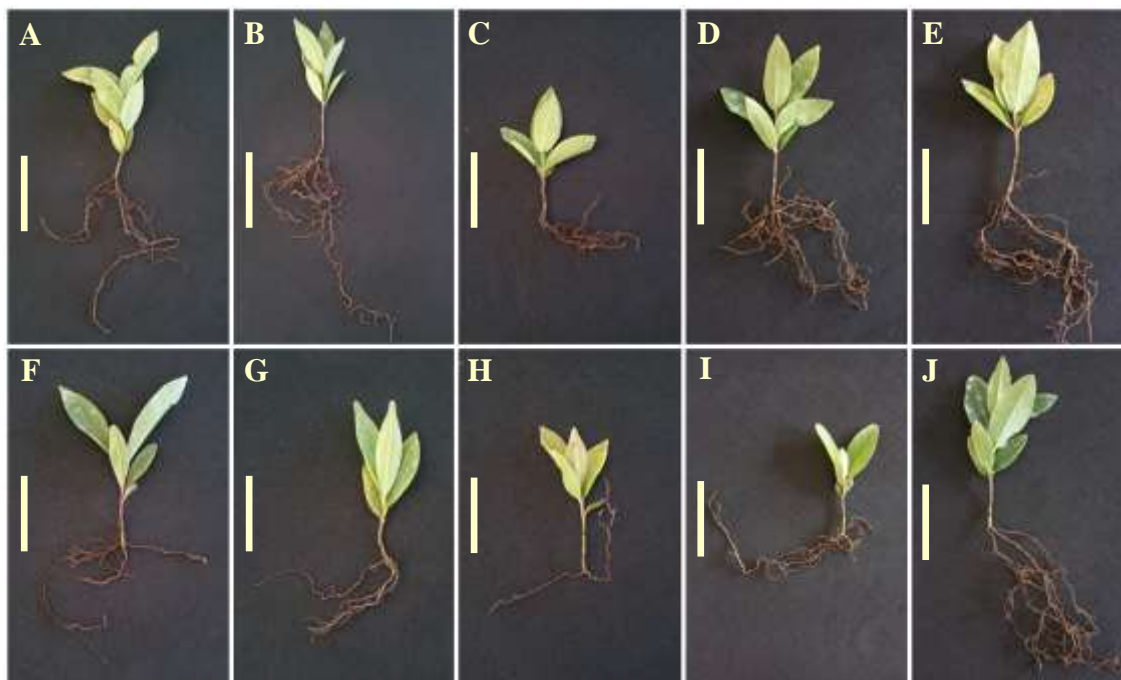
Os FPCV utilizados neste trabalho além de sintetizarem auxina, proporcionando o enraizamento das plantas de mangabeira aclimatizadas sem raízes, também são solubilizadores de fosfato, podendo disponibilizar fósforo para as plantas, promovendo seu maior crescimento, além de produzirem enzimas extracelulares que permitem atuar como agentes de controle de patógenos, acarretando na maior sobrevivência das mudas ao final da aclimatização (Figura 1).

Outros autores também destacam o incremento no crescimento de diferentes plantas, quando estas foram inoculadas com estes microrganismos, como pode ser observado em mudas micropropagadas de morango inoculadas durante a aclimatização com *Gliocladium catenulatum*, *T. harzianum*, *Bacillus subtilis* e *T. harzianum* + *B. subtilis* que obtiveram maior crescimento de (VESTBERG et al., 2004). Microestacas de *Eucalyptus* sp. após inoculação de isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram maior sobrevivência e enraizamento (FORTES et al., 2007). Maior comprimento médio de raízes, massa fresca de raiz de plantas de pepino foram detectadas com a inoculação de *Trichoderma asperellum* Q1 (LEI; Ya-q, 2015). Gravel, Antoun e Tweddell (2007), relataram aumento do peso fresco de parte aérea e raízes de plantas de tomate inoculadas com *Trichoderma atroviride*.

A inoculação de FPCV no momento da aclimatização (0 dias) visualmente proporcionou plantas com menor número de folhas expandidas e volume de raízes adventícias (Figura 2A). Enquanto as plantas inoculadas aos 5 dias após a aclimatização com estes isolados exibiram folhas expandidas menores, maior volume e comprimento de raízes adventícias (Figura 2B). Aos 10 dias de inoculação, as plantas tiveram menor número, expansão de folhas, volume e comprimento de raízes adventícias (Figura 2C). As plantas inoculadas aos 15 dias foram as que obtiveram folhas maiores e expandidas, com maior volume de raízes adventícias. Aos 20 dias as plantas exibiram folhas expandidas maiores, porém em menor número e raízes com maior volume e comprimento (Figura 2E).

A co-inoculação FMA + FPCV aos 0 (Figura 2F) e 5 dias (Figura 2G) proporcionaram plantas com menor número de folhas expandidas e volume de raízes adventícias. As plantas quando inoculadas aos 10 (Figura 2H) e 15 dias (Figura 2I) mostraram as mesmas características das anteriores, porém com folhas menores. Aos 20 dias, a co-inoculação proporcionou as plantas de mangabeira maior número e tamanho de folhas e volume e comprimento de raízes adventícias (Figura 2J).

**Figura 2-** Plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas com fungos promotores do crescimento vegetal em diferentes dias após a aclimatização e *Glomus clarum*, em casa de vegetação. Inoculação com FPCV: 0 dias (A); 5 dias (B); 10 dias (C); 15 dias (D) e 20 dias (E). Inoculação com FMA + FPCV: 0 dias (F); 5 dias (G); 10 dias (H); 15 dias (I) e 20 dias (J). Barra= 10 mm.



Fonte: Elaboração do autor.

As mudas micropropagadas de mangabeira foram beneficiadas com a inoculação da mistura de FPCV aos 20 dias após a aclimatização, com maior porcentagem de sobrevivência e enraizamento. A inoculação com FPCV proporcionou maior crescimento das plantas, obtendo maior comprimento médio de parte aérea, área foliar, razão da área foliar, peso da massa fresca e seca das raízes, caule e parte aérea, além de maior relação PMFR/PMFP e PMSR/PMSP.

### **Ensaio II – Métodos de inoculação de FPCV em mudas aclimatizadas de mangabeira, na presença ou ausência do FMA *Glomus clarum***

Entre os métodos de inoculação, as maiores porcentagens de sobrevivência e enraizamento foram observadas na presença do FMA associado aos tratamentos de inoculação com FPCV por pulverização, o qual não diferiu do controle, ou da inoculação próximo ao colo da planta + pulverização das plantas (I + P), na ausência de *G. clarum* (Tabela 5).

**Tabela 5-** Porcentagem de sobrevivência, enraizamento e peso da massa fresca das raízes de plantas micropropagadas de mangabeira aclimatizadas com diferentes métodos de inoculação de fungos promotores do crescimento vegetal em ausência ou presença de *Glomus clarum*, em casa de vegetação.

Métodos de inoculação	<i>Glomus clarum</i>					
	Ausência	Presença	Ausência	Presença	Ausência	Presença
	Sobrevivência (%)		Enraizamento (%)		Massa fresca das raízes (g)	
Colo da planta (I)	60,0 Ba	53,3 Cb	60,0 Ba	33,3 Cb	1,6 Aa	1,5 Ab
Pulverização (P)	53,3 Cb	93,3 Aa	53,3 Cb	80,0 Aa	1,5 Ba	1,5 Aa
I + P	86,7 Aa	60,0 Bb	86,7 Aa	46,7 Bb	1,5 Ba	1,6 Aa
P + P (24 h)	60,0 Ba	53,3 Cb	53,3 Ca	33,3 Cb	1,6 Aa	1,5 Aa
Controle	40,0 Db	93,3 Aa	40,0 Db	80,0 Aa	1,5 Ba	1,5 Aa
Valor de F	103,82*		106,3*		3,57*	
CV (%)	2,0		2,3		4,2	

Nota: Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, para cada variável, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey. \*Significativo a 5%. CV (%)= coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração do autor.

Desta forma, todos os tratamentos de inoculação de FPCV, na ausência de *G. clarum*, diferiram do controle não inoculado e proporcionaram os maiores valores de sobrevivência e enraizamento. O mesmo não foi encontrado para peso da massa fresca das raízes sendo os maiores valores verificados na ausência do FMA, mas com inoculação próximo ao colo da planta (I). Entre isolados de FPCV, quando não inoculado com FMA, os maiores valores da massa fresca das raízes foram encontrados para os tratamentos de inoculação no colo da planta (I) e pulverizadas em dois tempos (P + P 24 h) (Tabela 5).

Os FPCV utilizados neste trabalho além de sintetizarem auxinas, e com isso promoverem o enraizamento das plantas (Tabela 5), também são solubilizadores de fosfato, podendo disponibilizar fósforo para as plantas de mangabeira, promovendo o maior crescimento destas e produzem enzimas extracelulares, podendo atuar como agentes de controle de patógenos. Além disso, a inoculação destes em mistura torna-se benéfica por propicia uma maior competição com micro-organismos nativos do solo, colonização e estabelecimento no novo ambiente e com isso serem capaz de expressar suas características de promotores do crescimento vegetal (MITTAL et al., 2008).

Independente dos tratamentos de inoculação com FPCV, a não inoculação de *G. clarum* proporcionou os maiores valores para todas as variáveis estudadas, ou seja, maior comprimento médio da parte aérea, da maior raiz, diâmetro médio de caule, número médio de entrenós, peso da massa fresca e seca das raízes, e para as relações PMFR/PMFP e PMSR/PMSP (Tabela 6).

**Tabela 6-** Comprimento médio da parte aérea, maior raiz, diâmetro médio do caule, número médio de entrenós, peso da massa fresca e seca das raízes, relação peso da massa fresca das raízes/peso da massa fresca da parte aérea (PMFR/PMFP) e peso da massa seca das raízes/peso da massa seca da parte aérea (PMSR/PMSP) de plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas *ex vitro* em presença ou ausência de *Glomus clarum* na aclimatização, em casa de vegetação.

<i>G. clarum</i>	Comprimento médio da parte aérea (cm)	Comprimento médio da maior raiz (cm)	Diâmetro médio do caule (mm)	Número médio de entrenós
Ausência	4,01 A	10,43 A	1,83 A	6,20 A
Presença	3,26 B	6,66 B	1,42 B	5,45 B
Valor de F	7,00*	13,72*	5,67*	4,23*
CV (%)	38,69	59,74	28,55	30,91
	Peso da massa fresca das raízes (g)	Peso da massa seca das raízes (g)	PMFR/PMFP	PMSR/PMSP
Ausência	1,49 A	1,41 A	0,46 A	0,49 A
Presença	1,27 B	1,24 B	0,39 B	0,42 B
Valor de F	6,24*	4,52*	7,11*	5,21*
CV (%)	30,8	31,0	31,0	31,0

Nota: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, para cada variável, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey. \*Significativo a 5%. CV (%)= coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração do autor.

Tais resultados corroboram com os obtidos por Stancato e Silveira (2010) e Kunze et al. (2014) com a inoculação de FMA durante a aclimatização mudas de antúrio e abacaxi, respectivamente. A inoculação de FMA também inibiu o crescimento do porta enxerto de macieira M.9, entretanto a presença do FMA teve efeito positivo no crescimento do porta enxerto Marubakaido durante a aclimatização (LOCATELLI; LOVATO, 2002). A maior porcentagem de enraizamento, comprimento de raízes e número de raízes laterais, comprimento médio de parte aérea, área foliar, massa fresca e seca de parte aérea, caule e raízes de plantas de crisântemo foi obtida com a inoculação de FMA (SOHN et al., 2003).

Apesar do *G. clarum* não ter proporcionado aumento para algumas variáveis (Tabela 3), a sua presença garantiu às mudas de mangabeira maior porcentagem de sobrevivência e enraizamento (Tabela 5), como também por Gonçalves et al. (2015) em mudas inoculadas de *S. parahyba* var. *amazonicum*, com redução de mortalidade destas durante períodos de estresse.

Para relações PMFP/PMFT e PMSP/PMST a presença do FMA foi benéfica para as plantas de mangabeira durante a aclimatização (Tabela 7). A associação com este microrganismo beneficia as plantas por meio da melhoria do estado nutricional, ocorrendo

maiores taxas sobrevivência e alocação de biomassa, além de aumentar a densidade do sistema radicular, ajudando na recuperação, quando as plantas são submetidas a estresse hídrico (CAVALCANTE; GOTO; MAIA, 2009).

**Tabela 7-** Relação peso da massa fresca da parte aérea/peso da massa fresca total (PMFP/PMFT) e peso da massa seca da parte aérea/peso da massa seca total (PMSP/PMST) de plantas micropropagadas de mangabeira inoculadas *ex vitro* em presença ou ausência de *Glomus clarum* na aclimatização, em casa de vegetação.

<i>Glomus clarum</i>	PMFP/PMFT	PMSP/PMST
Ausência	0,68 B	0,67 B
Presença	0,73 A	0,72 A
Valor de F	6,50*	5,19*
CV (%)	12,5	13,35

Nota: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, para cada variável, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey. \*Significativo a 5%. CV (%)= coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração do autor.

As plantas de mangabeira obtiveram incremento na biomassa da parte aérea com a utilização do FMA (Tabela 7), a associação com este microrganismo promove aumento da absorção de nutrientes e água por meio das raízes das plantas, favorecendo com isso o aumento do peso da massa da parte aérea. Além de promoveram maior tolerância a estresse, ocorrendo baixa quantidade de perdas de plantas micropropagadas, como observado neste trabalho (Tabela 5) (OLIVEIRA et al., 2011).

A área foliar e razão da área foliar das plantas micropropagadas de mangabeira foram maiores utilizando como métodos na aclimatização a inoculação próxima ao colo das plantas + pulverização das plantas (I + P) (Tabela 8). A eficiência simbiótica foi positiva para a inoculação próximo ao colo das plantas (I) na ausência do *G. clarum*. Para a pulverização das plantas (P) e inoculação próximo ao colo das plantas + pulverização das plantas (I + P) com a presença do FMA os métodos tiveram eficiência simbiótica positiva.

Os resultados positivos de eficiência simbiótica para o método de pulverização (P) de FPCV nas plantas na presença do FMA, corroboram com a maior porcentagem e sobrevivência destas obtidas nesse método, demonstrando o efeito benéfico da metodologia utilizada juntamente com os FPCV na obtenção de maior número de mudas de mangabeira ao final da aclimatização (Tabela 5). Supõe-se que, com a pulverização das plantas ocorreu uma maior proteção da planta com menor perda de água inicial e ataque de patógenos

**Tabela 8-** Área foliar, razão da área foliar e eficiência simbiótica de plantas micropropagadas de mangabeira aclimatizadas com diferentes métodos de inoculação de fungos promotores do crescimento vegetal, em casa de vegetação.

Métodos de inoculação	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Razão da área foliar (cm <sup>2</sup> mg <sup>-1</sup> )	Eficiência simbiótica <sup>(1)</sup>	
			Ausência <i>G. clarum</i>	Presença <i>G. clarum</i>
Colo da planta (I)	3,05 AB	0,68 AB	2,71	-0,33
Pulverização (P)	2,04 AB	0,46 AB	-2,37	0,33
I + P	3,39 A	0,76 A	-1,02	0,66
P + P (24 h)	2,08 AB	0,47 AB	-0,68	-1,67
Controle	1,24 B	0,28 B	--	--
Valor de F	2,11*	3,69*	--	--
CV (%)	46,12	45,53	--	--

Nota: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, para cada variável, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey. \*Significativo a 5%. CV (%) = coeficiente de variação. <sup>(1)</sup> Eficiência simbiótica = [(matéria seca de parte aérea da planta inoculada/ matéria seca da parte aérea do controle) -1] X 100.

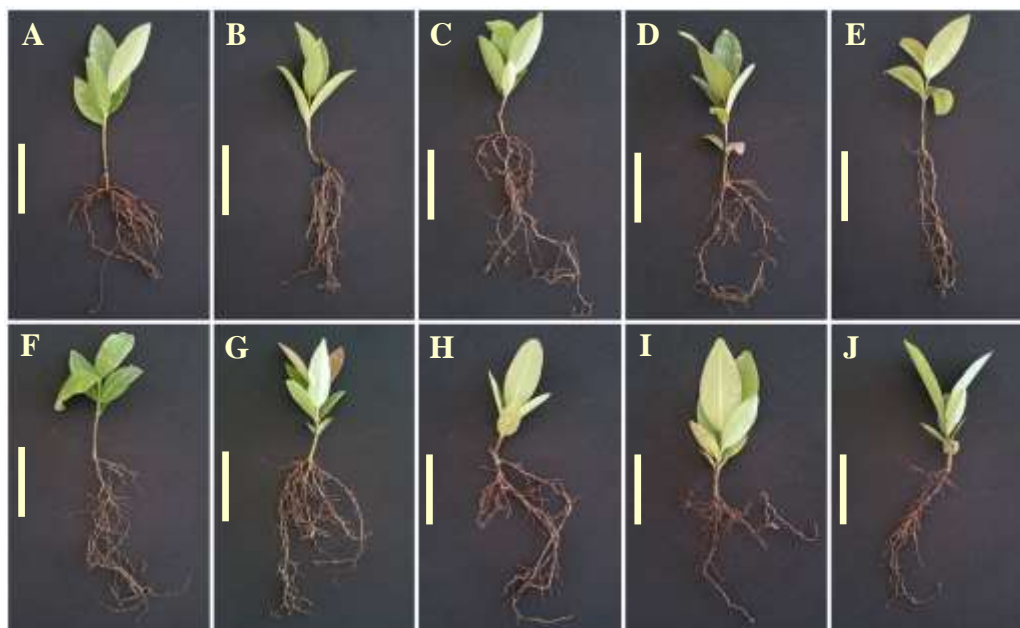
Fonte: Elaboração do autor.

Na ausência de *G. clarum*, a inoculação de FPCV próximo ao colo das plantas (I) visualmente proporcionou plantas com maiores folhas expandidas em menor quantidade e raízes com volume e comprimento menores (Figura 3A). As plantas pulverizadas com FPCV mostraram menor número de folhas, volume e comprimento de raízes adventícias (Figura 3B). O método de inoculação próximo ao colo das plantas (I) associado à pulverização das plantas (I + P) e pulverização das plantas no momento da aclimatização e 24 h depois (P + P) proporcionou maior número de folhas expandidas, volume e comprimento das raízes adventícias (Figura 3C e 3D). Plantas não obtiveram inoculadas com FPCV e *G. clarum* exibiram menor número de folhas, volume e comprimento de raízes adventícias (Figura 3E).

A inoculação dos FPCV próximo ao colo das plantas (I) na presença de *G. clarum* proporcionou plantas com folhas expandidas maiores em menor número e raízes adventícias de menor volume (Figura 3F). Enquanto a pulverização (P) das plantas micropropagadas propiciou maior número de folhas, volume e comprimento de raízes adventícias (Figura 3G).

Plantas inoculadas próximo ao colo das plantas + pulverização (I + P) apresentaram menor número de folhas expandidas com maior comprimento e volume de raízes adventícias (Figura 3H). Maiores folhas expandidas, com plantas de menor volume e comprimento de raízes adventícias foram obtidas com a pulverização dos FPCV no momento da aclimatização e 24 h depois (P + P). A ausência de inoculação dos FPCV propiciou plantas com menor número de folhas, volume e comprimento de raízes adventícias.

**Figura 3-** Plantas micropropagadas de mangabeira aclimatizadas com diferentes métodos de inoculação de fungos promotores do crescimento vegetal em ausência ou presença de *Glomus clarum*, em casa de vegetação. Ausência de *Glomus clarum*: Inoculação próximo ao colo da planta (I) (A); Pulverização (P) (B); I + P (C); P + P (D) e sem inoculação (E). Presença de *G. clarum*: Inoculação próximo ao colo da planta (I) (F); Pulverização (P) (G); I + P (H); P + P (I) e *G. clarum* (J). Barra= 10 mm.



Fonte: Elaboração do autor.

As maiores porcentagens de sobrevivência e enraizamento das mudas de mangabeira foram obtidas com os FPCV utilizando o método de inoculação próximo ao colo das plantas + pulverização das plantas (I + P) em ausência de FMA ou com a pulverização das plantas (P) na presença de *G. clarum*. No entanto, a segunda metodologia descrita é a mais prática e fácil de utilização, tornando possível uma aclimatização rápida e eficiente das plantas de mangabeira.

Independente do método de inoculação de FPCV, na ausência de *G. clarum*, foi detectado o maior crescimento das mudas, com maior comprimento médio de parte aérea, raiz, diâmetro de caule, número médio de entrenós, peso da massa fresca e seca das raízes, relação PMFR/PMFP e PMSR/PMSP. Na presença de *G. clarum* as maiores relações PMFP/PMFT e PMSP/PMST das mudas micropropagadas de mangabeira durante a aclimatização, foram verificados

#### 4 CONCLUSÕES

Maior porcentagem de sobrevivência e enraizamento de plantas micropropagadas de mangabeira foi obtida com a inoculação de FPCV aos 20 dias após a aclimatização, proporcionando maior crescimento das mudas micropropagadas de mangabeira na aclimatização.

A pulverização das plantas com FPCV, em presença de *G. clarum*, foi o método mais adequado por proporcionar maior sobrevivência e enraizamento das mudas micropropagadas de mangabeira aclimatizadas.

Com a inoculação de *G. clarum* ocorreu maiores relações peso da massa fresca da parte aérea/peso da massa fresca total e peso da massa seca da parte aérea/peso da massa seca total das mudas micropropagadas de mangabeira durante a aclimatização.

## REFERÊNCIAS

- AGUADO-SANTACRUZ, G. A.; MORENO-GÓMEZ, B.; JIMÉNEZ-FRANCISCO, B.; GARCÍA-MOYA, E.; PRECIANDO-ORTIZ, R. E. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. **Revista Fitotecnia Mexicana**, Chapingo, 35, n.1, p. 9-21, 2012.
- ANZANELLO, R.; SOUZA, P. V. D.; CASAMALI, B. Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em porta-enxertos micropropagados de videira. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 2, p. 409-415, 2011.
- CABRAL, J. S. R. **Otimização de parâmetros físicos-químicos e microbiológicos no estabelecimento *in vitro* de explantes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) e na sua promoção do crescimento**. 2012. 188 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde. Rio Verde, 2012.
- CALDAS, L. S.; MACHADO, L. de L.; CALDAS, S. C.; CAMPOS, M. L.; CALDAS, J. A.; PHARIS, R. P.; PEREIRA-NETTO, A. B. Growth-active gibberellins overcome the very slow shoot growth of *Hancornia speciosa*, an important fruit tree from the Brazilian “Cerrado”. **Trees**, Vancouver, v. 23, n. 6, p. 1229-1235, 2009.
- CAVALCANTE, U. M. T.; GOTO, B. T.; MAIA, L. C. Aspectos da simbiose micorrízica arbuscular. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 5 e 6, p. 180-208, 2008-2009.
- COSTA, C. M. C.; CAVALCANTE, U. M. T.; GOTO, B. T.; SANTOS, V. F. dos; MAIA, L. C. Fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada em mudas de mangabeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 40, n. 3, p. 225-232, 2005.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FORTES, F. O.; SILVA, A. C. F.; ALMANÇA, M. A. K.; TEDESCO, S. B. Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 2, p. 221-228, 2007.
- GONÇALVES, P. J. R. O.; OLIVEIRA, A. G.; FREITAS, V. F.; CHIARI, N. A.; NAVARRO, M. P.; CELY, M. T.; LEAL, A. C.; ANDRADE, G. Plant growth-promoting microbial inoculant for *Schizolobium parahyba* pv. *parahyba*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 39, n. 4, p. 663-670, 2015.
- GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R. J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, n. 8, p. 1968-1977, 2007.
- KUNZE, A.; LOVATO, P. E.; COSTA, M. D.; VESCO, L. L. D. Pineapple (*Ananas comosus*) cv. Pérola ex vitro growth and mycorrhizal colonization affected by in vitro sucrose concentration. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 3, p. 766-770, 2014.

LEI, Z.; YA-qing, Z. Effects of phosphate solubilization and phytohormone production *Trichoderma asperellum* Q1 on promoting cucumber growth under salt stress. **Journal of Integrative Agriculture**, Beijing, v. 14, n. 8, p. 1588-1597, 2015.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Carlisle, v. 30, p. 421-327, 1980.

LOCATELLI, L. M.; LOVATO, P. E. Inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta-enxertos de macieira micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 2, p. 177-184, 2002.

MARIANO, R. de L. R.; SILVEIRA, E. B. da; ASSIS, S. M. P. de; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.

MITTAL, V.; SINGH, O.; NAYYAR, H.; KAUR, J.; TEWARI, R. Stimulatory effect of phosphate-solubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 3, p. 718-727, 2008.

MOREIRA, A. L. L.; ARAÚJO, F. F. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* spp. como potenciais promotores de crescimento de *Eucalyptus urograndis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 37, n. 5, p. 933-943, 2013.

MOREIRA, B. C.; MENDEES, F. C.; MENDES, I. R.; PAULA, T. A.; PRATES JUNIOR, P.; SALOMÃO, L. C. C.; STURMER, S. L.; OTONI, W. C.; GUARÇONI, A. M.; KASUYA, M. C. M. The interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Piriformospora indica* improves the growth and nutrient uptake in micropropagation-derived pineapple plantlets. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 197, p. 183-192, 2015.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 15, p 473-479, 1962.

OLIVEIRA, A. G.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; SANTOS, G. R.; MILLER, L. O.; CHAGAS, L. F. B. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 7, n. 3, p. 149-155, 2012.

OLIVEIRA, J. R. G.; MORAIS, T. A. L.; MELO, N. F.; YANO-MELO, A. M. Acclimatization of *Tapeinochilos ananassae* plantlets in association with arbuscular mycorrhizal fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 46, n. 9, p. 1099-1104, 2011.

RAHI, P.; VYAS, P.; SHARMA, S.; GULATI, A.; GULATI, A. Plant growth promoting potential of the fungus *Discosia* sp. FIHB 571 from tea rhizosphere tested on chickpea, maize and pea. **Indian Journal Microbiology**, Pune, v. 49, n. 2, p. 128-133, 2009.

SAMPAIO, T. S.; NOGUEIRA, P. C. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, Oxford, v. 95, n. 4, p. 606-610, 2006.

SANTOS, M. H. L. C.; MARIANO, R. de L. R.; CAMARA, T. R.; ANDRADE, A. G. de; WILLADINO, L.; LIMA, G. P. P. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. **Hoehnea**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 2-8, 2005.

SANTOS, P. C. G. dos; ALVES, E. U.; GUEDES, R. S.; SILVA, K. B.; CARDOSO, E. de A.; LIMA, C. R. de. Qualidade de sementes de *Hancornia speciosa* Gomes em função do tempo de secagem. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 343-352, 2010.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A. de; NOGUEIRA, R. C.; EMRICH, E. C.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes de caulinares de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, 2007a.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; CAMPOS, A. C. A. L.; PORTO, J. M. P.; NOGUEIRA, R. C.; STEIN, V. C. Germinação de sementes de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1180-1182, 2007b.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; STEIN, V. C.; NERY, F. C.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA<sub>3</sub> e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1847-1852, 2009.

SOHN, B. K.; KIM, K. Y.; CHUNG, S. J.; KIM, W. S.; PARK, S. M.; KANG, J. G.; RIM, Y. S.; CHO, J. S.; KIM, T. H.; LEE, J. H. Effect of the different timing of AMF inoculation on plant growth and flower quality of chrysanthemum. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 173-183, 2003.

STANCATO, G. C.; SILVEIRA, A. P. D. Micorrização e adubação de mudas micropropagadas de antúrio, cv. Eidibel: crescimento e aclimatização *ex vitro*. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 4, p. 957-963, 2010.

VESTBERG, M.; KUKKONEN, S.; SAARI, K.; PARIKKA, P.; HUTTUNEN, J.; TAINIO, L.; DEVOS, N.; WEEKERS, F.; KEVERS, C.; THONART, P.; LEMOINE, M. C.; CORDIER, C.; ALABOUVETTE, C.; GIANINAZZI, S. Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 27, n. 3, p. 243-258, 2004.

### **CONCLUSÃO GERAL**

A associação do saco plástico como câmara úmida com o substrato Bioplant<sup>®</sup>, seguido da pulverização de FPCV e inoculação do FMA *Glomus clarum* é o método mais adequado para aclimatização de plantas micropropagadas de mangabeira, em casa de vegetação.