



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CAMPUS DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL

Angélica Ricarte da Silva

**Micropropagação e uso de fungos micorrízicos
arbusculares para estabelecimento e produção de plantas
de bastão do imperador [*Etlingera elatior* (Jack) R.M.
Smith] na região do Submédio do Vale do São Francisco**

Petrolina - PE

2016

ANGÉLICA RICARTE DA SILVA

**Micropropagação e uso de fungos micorrízicos
arbusculares para estabelecimento e produção de plantas
de bastão do imperador [*Etlingera elatior* (Jack) R.M.
Smith] na região do Submédio do Vale do São Francisco**

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em
Agronomia – Produção Vegetal
do *Campus* de Ciências Agrárias
da Universidade Federal do Vale
do São Francisco, como parte
dos requisitos para a obtenção
do título de Mestre em
Agronomia – Produção Vegetal.

Orientador: Profª Drª Adriana Mayumi
Yano-Melo
Coorientador: Dr. Nataniel Franklin de
Melo

Petrolina - PE

2016

S586m Silva, Angélica Ricarte da
Micropropagação e uso de fungos micorrízicos arbusculares para estabelecimento e produção de plantas de bastão do imperador [*Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith] na região do Submédio do Vale do São Francisco / Angélica Ricarte da Silva. -- Petrolina, 2016. 95 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina, 2016.

Orientadora: Profª Drª Adriana Mayumi Yano-Melo.

Referências.

1. Produção Vegetal. 2 Cultivo *in vitro*. 3. Fungos. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco

CDD 631.53

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CAMPUS DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

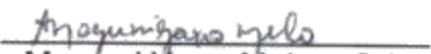
Angélica Ricarte da Silva

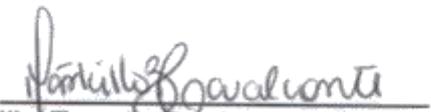
Micropropagação e uso de fungos micorrízicos arbusculares para estabelecimento e produção de plantas de bastão do imperador [*Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith] na região do Submédio do Vale do São Francisco

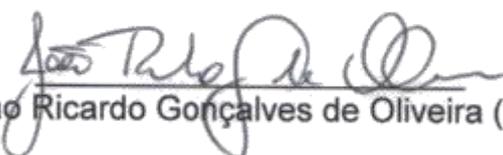
Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Produção Vegetal, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Aprovada em: 29 de Julho de 2016.

Banca Examinadora


Prof^a Dr^a Adriana Mayumi Yano-Melo – Orientadora (Univasf)


Prof^a Dr^a Márkilla Zunete Beckmann-Cavalcante (Univasf)


Dr. João Ricardo Gonçalves de Oliveira (UFPB)

*A Deus,
a quem sirvo com temor, a Ele que é o criador de todas as coisas, o meu Senhor e
Salvador, O que em tudo me sustém com a destra de Sua mão, que nunca
desampara os Seus, Aquele que é indescritível, que tem um amor verdadeiramente
incondicional pela humanidade, que deu o Seu único filho para vir ao mundo buscar
e salvar todos nós que estávamos (e aos que ainda estão) perdidos. A Ele toda
honra, glória e louvor eternamente. Tudo o que tenho e sou vem dEle, tudo por Ele e
para Ele!*

Aos meus pais, José Duque da Silva e Nair Ricarte de Souza

*A vocês devo toda minha educação e personalidade. Ensinam-me a viver e me
aconselham dia após dia; mesmo estando longe, sempre estiveram perto. Não sei
como agradecer. Amo-lhes eternamente.*

*Aos meus irmãos, Adriano, Josair, André, Cristiane, Janaina e Alan e meu amado e
futuro esposo Leonardo Augusto*

*Vocês me fazem crescer a cada dia, acolhem-me sempre que necessário, são o
motivo de minhas alegrias e estão sempre comigo. Somos todos um, que Deus nos
consERVE assim e abençoe a cada um de vós.*

*Aos meus tios Paulo Ramos e Zélia Nunes e primos Paloma Nunes e Breno Nunes,
foram responsáveis pela minha formação, acolheram-se me na intimidade do seu lar,
confiaram em mim e me deram todo o apoio que precisei, ensinaram-me muitas
coisas que guardarei por toda a vida. É uma linda família, que muitos frutos de
alegria e bênçãos venham sobre vocês. Oro para que Deus vos abençoe a cada dia
e que possam abençoar tantas outras pessoas, como fizeram comigo. Minha
gratidão a vocês não dá para medir e é eterna, para onde eu for levarei vocês
comigo!*

A cada um de vós dedico o fruto do meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sua infinita misericórdia e graça para comigo. Este trabalho é resultado de toda a força e capacidade que Ele me deu. A Ti, Senhor, glória, honra e louvor para todo o sempre. Amém.

Sou grata a toda minha família e ao meu amado noivo e tão logo esposo Leonardo Augusto, o apoio de vocês foi crucial para eu obter êxito. Deram-me esperanças e me fortaleceram na caminhada até aqui. A conquista que Deus me deu também é vossa. Amo vocês.

A minha orientadora, Dra. Adriana Mayumi Yano-Melo, uma mulher exemplar. Tenho grande admiração por sua pessoa e sou grata a Deus por cada oportunidade que tive de tê-la ao meu lado, pude crescer muito e aprender coisas novas a cada projeto. Que não haja dúvida de que todo o conhecimento que conquistei na minha carreira acadêmica até hoje teve grande influência sua, levarei isto comigo para onde for; eu não seria a mesma se não fosse por a senhora, com certeza! Posso dizer: “é minha mãe científica!” e também minha amiga. À senhora, professora, meu muitíssimo obrigada! Serei eternamente grata!

Ao meu Coorientador, Dr. Nataniel Franklin de Melo, por todo o tempo dedicado para me auxiliar e apoiar durante todo o mestrado, sua orientação foi fundamental para o desempenho de minhas atividades, contribuindo também para o meu crescimento profissional. Muito obrigada!

Agradeço aos meus professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Produção Vegetal da Univasf e a todos os meus colegas pela parceria e amizade. Em especial, sou grata a Maria Herlândia por todos os momentos juntas, pela confiança e amizade.

Aos meus colegas e equipe do Laboratório de Microbiologia da Univasf/CCA: Alícia, Aline, Danielle Karla, Daniela, Inácio, Karen, Khatianne, Lílian, Luis, Maria Eugênia, Matheus, Poliana e Tamires pela amizade, parceria e todo o trabalho em equipe. Peço desculpas se esqueci de citar alguém. Em especial, agradeço a Maria Valdirene por todos os momentos juntas, pela confiança e amizade.

A toda a equipe do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido por todo o apoio e a parceria. Aprendi muito com vocês. Gostaria de agradecer especialmente a Carla, Maiany, Ângela, Francisco e Sr. Elenício, meus dias com vocês me ajudaram conduzir os trabalhos com mais alegria.

À Embrapa Semiárido pelo espaço e parceria para execução dos trabalhos.

À Facepe pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao CNPq e a Facepe pelo auxílio financeiro e disponibilidade de recursos necessários à realização do projeto de dissertação.

À Univasf pela oportunidade de realizar e concluir o mestrado acadêmico.

Por fim, a todos que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e minha formação profissional.

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável”. (Galileu Galilei)

RESUMO

O cultivo *in vitro* de plantas é uma técnica que propicia sua produção em larga escala e isentas de micro-organismos, a qual, aliada ao uso de hormônios vegetais como citocininas e auxinas, pode ser utilizada para aperfeiçoar o sistema produtivo de plantas de bastão do imperador [*Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith]. Contudo, as plantas micropropagadas são muito sensíveis e a aclimatização torna-se uma etapa crítica. Neste sentido, a utilização de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) é uma alternativa para auxiliar a planta a sobreviver sob as condições adversas do transplante, promovendo melhor estabelecimento das plantas. Assim, o presente trabalho teve como objetivo geral otimizar a micropropagação e aclimatização de plantas de *E. elatior* e verificar a influência da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares no seu estabelecimento e produção. Para isto, plantas de *E. elatior* foram cultivadas *in vitro* em meio MS, suplementado ou não com reguladores de crescimento, para testar qual a melhor dose e combinação de auxina e/ou citocinina sobre o desenvolvimento de brotos. Em seguida, as plantas foram aclimatizadas em casa de vegetação e submetidas a tratamentos de inoculação micorrízica, visando o estabelecimento das mesmas para obtenção de mudas para campo. Os resultados mostraram efeito sinérgico de citocinina e auxina sobre o cultivo *in vitro* das plantas, com destaque para a citocinina. A inoculação com FMA foi positiva para obtenção de maior desempenho das plantas tanto na etapa de aclimatização como no estabelecimento em campo, proporcionando maior biomassa e produção de perfilhos por touceira. Conclui-se, portanto, que o uso de reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* e de FMA na aclimatização e estabelecimento em campo promovem benefícios para obtenção de plantas de *E. elatior* com maior desenvolvimento.

Palavras-chave: Bioinsumo, Micorriza arbuscular, Cultivo *in vitro*, Produção vegetal, *Etilingera elatior*, Planta tropical.

ABSTRACT

The *in vitro* growth of plants is a technique that provides its production on large scale and without microorganisms, and allied to use of phytohormones as cytokinin and auxin, which can be used to improve the production system of *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith. However, micropropagated plants are very sensitive and the acclimatization becomes a critical step. In this sense, the use of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) is an alternative to help plants to survive under adverse conditions of transplanting, promoting better plant establishment. Thus, this study aimed to optimize the micropropagation and acclimatization of plants of *E. elatior* and the influence of inoculation with AMF in their establishment and production. Plants of *E. elatior* were grown *in vitro* on MS medium, supplemented or not with growth regulators, to test the best dose and combination of auxin and/or cytokinin on shoot development. Next, the plants were acclimatized in greenhouse and submitted to mycorrhizal inoculation treatments, aiming its establishment to obtain seedlings for the field experiment. The results showed synergic effect of cytokine and auxin on the *in vitro* cultivation, highlighting for cytokinin. AMF inoculation provides higher development of plant either in acclimatization and field, promoting higher biomass and production of tillers per plant. It was concluded that the use of growth stimulators *in vitro*, and inoculation with AMF in the acclimatization and establishment in the field provides benefits to obtain plants of *E. elatior* with better development.

Keywords: Bioinsumos, arbuscular mycorrhizal, *in vitro* growth, plant production, *Etilingera elatior*, tropical plants.

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	3
2.1. BASTÃO DO IMPERADOR	3
2.1.1. Aspectos botânicos	4
2.1.2. Usos e Propriedades	4
2.1.3. Propagação	6
2.2. MICROPROPAGAÇÃO	6
2.2.1. Cultivo <i>in vitro</i> de Plantas Ornamentais.....	8
2.2.2. Hormônios/Reguladores de Crescimento Vegetais.....	9
2.2.3. Aclimatização.....	11
2.3. FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES	12
2.4. MICORRIZA ARBUSCULAR NA HORTICULTURA	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
3. Micropropagação e aclimatização de plântulas de <i>Etlingera elatior</i> (Jack) R.M. Smith: uso de diferentes fitohormônios e substratos	23
RESUMO	23
3.1. Introdução	23
3.2. Material e Métodos	26
3.2.1. Obtenção de explantes	26
3.2.2. Preparo de meio e condições de cultivo	26
3.2.3. Aclimatização com diferentes tipos de substrato	27
3.2.4. Análise Estatística	28
3.3. Resultados	28
3.3.1. Efeito de diferentes concentrações de BAP e AIB na propagação <i>in vitro</i> de <i>E. elatior</i>	28
3.3.2. Efeito de diferentes tipos substratos na fase de aclimatização de <i>E. elatior</i> ...	33
3.4. Discussão	34
3.4.1. Efeito de diferentes concentrações de BAP e AIB na propagação <i>in vitro</i> de <i>E. elatior</i>	34
3.4.2. Efeito de diferentes tipos substratos na fase de aclimatização de <i>E. elatior</i> ...	36
3.5. Conclusões	38
Agradecimentos	40
Referências Bibliográficas	40
4. Aclimatização de Plantas Micropropagadas de <i>Etlingera elatior</i> (Jack) R. M. Inoculadas com Fungos Micorrízicos Arbusculares	42
RESUMO	42
4.1. Introdução	42
4.2. Material e Métodos	45
4.2.1. Micropropagação	45
4.2.2. Aclimatização e Delineamento experimental	45
4.2.3. Inóculo micorrízico	46
4.2.4. Medidas de crescimento da planta	46
4.2.5. Medidas da micorriza	47
4.2.6. Análise estatística	48
4.3. Resultados	48
4.4. Discussão	53
4.5. Conclusões	55
Agradecimentos	56

Referências	56
5. Estabelecimento em campo de plantas de bastão do imperador [<i>Etlingera elatior</i> (Jack) R.M. Smith] inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares	60
RESUMO	60
5.1. Introdução	60
5.2. Material e Métodos	62
5.2.1. Local de estudo e delineamento experimental	62
5.2.2. Adubação e condução do experimento	63
5.2.3. Preparo das mudas	64
5.2.4. Inóculo de FMA	65
5.2.5. Variáveis analisadas	65
5.2.6. Análise estatística	66
5.3. Resultados e Discussão	67
5.4. Conclusões	71
Agradecimentos	71
Referências Bibliográficas	71
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
ANEXO 1	75
ANEXO 2	76
ANEXO 3	79

1. INTRODUÇÃO

As flores e plantas ornamentais de clima tropical apresentam potencial de comercialização tendo em vista suas peculiaridades, como beleza diferenciada, exotividade, alta diversidade de formas e cores, dentre outras características que lhes imprime aceitação no mercado (LOGES et al., 2005).

Entre estas plantas, destaca-se *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Sm., uma espécie pertencente à família Zingiberaceae, conhecida como bastão do imperador, flor da redenção e gengibre de tocha, entre outros. Esta espécie possui beleza exuberante devido a sua folhagem e inflorescências em formato de roseta, bastante cerosas e semelhantes a uma tocha (BRAINER; OLIVEIRA, 2007). Esta planta é nativa do sudeste da Ásia - Indonésia, Malásia e sul da Tailândia e mundialmente cultivada nos trópicos (LIM, 2014).

Diversos estudos têm sido realizados com *E. elatior* devido às várias aplicações desta planta ornamental, dentre os quais podem ser citados trabalhos sobre: estabelecimento *in vitro* (COLOMBO et al., 2010; YUNUS et al., 2012, 2013), aclimatização utilizando substrato alternativo e diferentes volumes de recipientes (ASSIS et al., 2009; SANTOS et al., 2013), cultivo sob diferentes espaçamentos em clima subtropical (UNEMOTO et al., 2012) e avaliação das propriedades antioxidante, antibiótica (CHAN; LIM; OMAR, 2007; CHAN et al., 2009), fitoquímicas e farmacológicas (ARYA; KUMAR; GAUTAM, 2014; CHAN; LIM; WONG, 2011). Embora a produção desta planta seja apta no Nordeste brasileiro, ainda há carência de trabalhos sobre métodos eficientes para propagação e produção desta espécie na região semiárida.

De acordo com Lamas (2004), a produção adequada de mudas depende da qualidade das matrizes, as quais devem ser mantidas sobre rigoroso controle fitossanitário, e das técnicas de propagação utilizadas. Dentre os métodos de propagação, a cultura de tecidos possibilita a produção de plantas em larga escala com características desejáveis. A utilização da micropropagação permite redução de custos de produção, a partir de práticas que geram micropropágulos e plantas com a manutenção da qualidade do produto. Desta maneira, fitohormônios são utilizados, visando o aprimoramento desta técnica, os quais, a exemplo do 6-benzilaminopurina (BAP) e do ácido indolacético (AIA), proporcionaram maior obtenção de brotos de *E. elatior* na fase de isolamento (COLOMBO et al., 2010).

Por outro lado, o cultivo *in vitro* propicia a produção de plantas isentas de micro-organismos, incluindo os benéficos ao desenvolvimento vegetal, como os fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Estes fungos, pertencentes ao filo Glomeromycota, são biotróficos obrigatórios e formam simbiose com a maioria das espécies vegetais, interação esta que envolve, particularmente, a transferência de nutrientes entre os simbiosites, sendo esses essencialmente o C (da planta para o fungo) e o P (do fungo para a planta) (SMITH; SMITH, 2012), contribuindo no estabelecimento destas plantas, principalmente na fase de aclimatização (OLIVEIRA et al., 2011). Além disso, estes fungos são considerados componentes bióticos primários do solo e, portanto, quando negligenciados ou esquecidos pode-se reduzir a eficiência do funcionamento do ecossistema (BERRUTI et al., 2016).

Neste sentido, a aplicação de FMA no cultivo de plantas ornamentais em regiões semiáridas, pode auxiliar na produção da planta em condições de campo (MEIR et al., 2010). Porém, para Koltai (2010), existem dificuldades e demandas a serem enfrentadas no uso de FMA para a floricultura, o que requer adaptação do uso deste simbiote a cada uma das espécies e cultivares, devido a diferença no material de propagação ou práticas utilizadas no crescimento da planta.

Desta forma, torna-se imprescindível validar o uso de inoculantes de FMA em plantas-alvo para a tomada de decisões sobre a adoção da técnica considerando a relação custo-benefício. Assim, estudos com plantas ornamentais em associação com FMA na região semiárida do Brasil, especialmente o submédio Vale do São Francisco, podem contribuir para a diversificação de culturas e para o crescimento científico e econômico da região, fornecendo informações sobre o manejo e produção adequados destas plantas.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi otimizar a micropropagação e aclimatização de *E. elatior* e verificar a influência da inoculação com FMA no seu estabelecimento *ex vitro*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. BASTÃO DO IMPERADOR

A família Zingiberaceae é representada por espécies vegetais de clima tropical e subtropical e seu centro de diversidade se encontra na região biogeográfica da Malásia, sendo constituída por 52 gêneros e mais de 1.300 espécies (ENCYCLOPÆDIA BRITANNICA, 2015; SAKAI et al., 2013). No Brasil, o único gênero nativo é *Renealmia* e foram introduzidos os gêneros: *Alpinia*, *Burbridgea*, *Curcuma*, *Elletaria*, *Etingera*, *Globba*, *Hedychium*, *Kaempferia* e *Zingiber* (SOUZA; LORENZI, 2008).

O gênero *Etingera* se destaca pela beleza de suas espécies, sendo *Etingera elatior* uma das mais conhecidas. Segundo Wong (2008), para esta espécie, o nome do gênero foi dado em homenagem ao botânico alemão Andreas Ernst Etinger e o epíteto específico é devido ao seu significado em latim: “mais alto”. Essa espécie é nativa de países do sudeste asiático, como Malásia, Indonésia e Tailândia (LIM, 2014). Segundo Terao, Carvalho e Barroso (2005), esta é a espécie mais cultivada do gênero, tendo como principais países produtores: Filipinas, Tailândia, Jamaica, Estados Unidos (Havaí), Costa Rica e Equador. Ainda de acordo com esses autores, na importação destacam-se Estados Unidos, Canadá, Holanda, Alemanha, Dinamarca, Bélgica, França e Japão.

No Brasil, *E. elatior* possui alguns nomes populares, como rosa de porcelana, bastão do imperador, gengibre de tocha, flor da redenção e flor de cera. Os registros na literatura científica a respeito dessa planta com aplicação ornamental ainda são escassos, apesar do seu potencial para uso como produto da floricultura por apresentar peculiaridades que a torna uma planta tipicamente ornamental. De acordo com Lamas (2004), há quatro cultivares de maior importância comercial no Brasil, sendo elas: Red Torch (brácteas vermelhas), Pink Torch (brácteas rosadas), Porcelana (brácteas rosadas) e Tulipa Negra (brácteas rubras). No país, segundo Loges et al. (2008), as principais regiões produtoras dessa planta são Norte e Nordeste, com destaque para as áreas de Zona da Mata e Litoral do Nordeste, nos Estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará.

2.1.1. Aspectos Botânicos

Plantas do gênero *Etilingera* apresentam um padrão de crescimento atípico, os brotos florais crescem abaixo do solo, estando visíveis apenas estruturas parecidas com pétalas (labelo), um colar de flores brilhantes de coloração vermelha (ENCYCLOPÆDIA BRITANNICA, 2015). A espécie *E. elatior*, por sua vez, é caracterizada por ser uma planta rizomatosa herbácea perene, com porte ereto, podendo suas hastes vegetativas atingir até 6 m de altura e as florais, até 2 m, as quais se desenvolvem separadamente. As folhagens apresentam coloração de verde intenso a marrom-avermelhado (TERAO; CARVALHO; BARROSO, 2005; WONG, 2008).

Há variações de tonalidades das cores de suas inflorescências, o que define o nome das cultivares comerciais. Essa coloração varia entre vermelho escuro, vermelho claro, rosa, rosa claro, além de uma variedade conhecida como Branco de Sabá, devido à cor branca da inflorescência (LAMAS, 2004). Além disso, para a mesma espécie podem ser observadas variações no padrão fenotípico de cor e formato da inflorescência (COSTA et al., 2014).

As flores verdadeiras surgem entre as brácteas, numa estrutura de pinha (WONG, 2008), e os frutos são formados em conjunto, em uma estrutura chamada infrutescência, a qual pode apresentar coloração esverdeada, amarelo-alaranjada ou avermelhada e formato elipsoide, podendo o fruto ser às vezes subgloboso, com cerca de 2,5 cm de diâmetro. As sementes são produzidas em grande quantidade e são pequenas e pretas (LIM, 2014).

2.1.2. Usos e Propriedades

As espécies da família Zingiberaceae possuem, de modo geral, diversas aplicações, como na medicina, culinária, ornamentação e paisagismo, além de ser utilizada na higiene pessoal. São utilizadas várias partes da planta: folhas, haste, rizoma, brotações novas, flores e inflorescências, sementes e frutos para seus diversos fins, principalmente nos países asiáticos (CHAN; LIM; TAN, 2011; CHAN; LIM; WONG, 2011; LIM, 2014; MAIMULYANTI; PRIHADI, 2015).

Vários tipos de compostos fitoquímicos podem ser encontrados nas flores, folhas, hastes e rizomas de bastão do imperador, destacando-se as propriedades antioxidante (ABDELWAHAB et al., 2010; MAIMULYANTI; PRIHADI, 2015);

antimicrobiana (CHAN; LIM; OMAR, 2007; CHAN; LIM; WONG, 2011; LACHUMY et al., 2010); anticancerígena (HABSAH et al., 2005); inibição da tirosinase, uma enzima fundamental na biossíntese de melanina, podendo causar pigmentação excessiva da pele (CHAN et al., 2008; SILVÉRIO; CASTRO; MIRANDA, 2013); e hepatoprotetiva (HALEAGRAHARA et al., 2010). Além disso, há registros do uso de parte da planta para limpeza de ferimentos e, juntamente com outras ervas aromáticas, como colônia pós-banho por mulheres após o parto (IBRAHIM; KHALID; HUSSIN, 2007; LIM, 2014).

Os rizomas podem apresentar altos teores de ferro (67,10 mg/100 g), comparado a outras espécies de Zingiberaceae (IBRAHIM; KHALID; HUSSIN, 2007). Além disso, as folhas e flores são também importantes produtos utilizados na culinária com teores nutricionais consideráveis (CHAN; LIM; TAN, 2011; LIM, 2014), e outras estruturas como brotações, botões florais e frutos também são consumidos pelos povos nativos do sudeste Asiático como condimentos, em saladas, como especiarias ou até mesmo cozidos (JEEVANI OSADEE WIJEKON; KARIM; BHAT, 2011; SIRIRUGSA, 1999; TERAQ; CARVALHO; BARROSO, 2005). De acordo com Wong (2008), as inflorescências fechadas são um importante ingrediente para rojak (salada de frutas e vegetais) e laksa (sopa), típicos da Malásia e Singapura.

Apesar dos poucos estudos registrados na literatura a respeito da aplicação do bastão do imperador como planta ornamental, esta apresenta alto potencial para a floricultura, a qual é propícia para cultivo em regiões tropicais, podendo ser comercializada como flor de corte e utilizada em decorações (CHAN; LIM; OMAR, 2007; LIM, 2014), além de ser uma excelente opção para o paisagismo (TERAQ; CARVALHO; BARROSO, 2005). O seu valor ornamental é evidenciado pela beleza de suas inflorescências, as quais são exóticas, assemelhando-se a uma tocha, e exuberância de sua folhagem, que se torna um elemento de decoração com qualidade e beleza (WONG, 2008).

Para Wong (2008), o bastão do imperador é imprescindível na composição de um jardim tropical, podendo também ser utilizado em jardins ecológicos, sendo suas flores atrativas para seu polinizador natural. Por outro lado, ainda há entraves para o setor produtivo e comercial de flores dessa planta com valor ornamental, principalmente em relação às suas características morfológicas e tempo de vida, que impossibilita a comercialização de flores abertas, sendo necessário antecipar o

ponto de corte e comercializar as flores ainda fechadas, em forma de botões, conhecidos como “castiçais” (MARCSIK et al., 2003).

2.1.3. Propagação

De acordo com Rodrigues (2007) os métodos de propagação de flores tropicais são realizados por meio de touceiras, rizomas, sementes e cultura de tecidos. O método tradicional de propagação de bastão do imperador é por meio dos rizomas, os quais devem ser tratados para evitar a proliferação de doenças (LOGES et al., 2008; WONG, 2008).

As mudas de bastão do imperador devem apresentar qualidade suficiente para que após o transplante não seja necessário realizar substituição, considerando que após a implantação das mudas serão emitidos os perfilhos, os quais irão se desenvolver e o cultivo irá se estabilizar, devendo-se, portanto, evitar o transplante (LOGES et al., 2008).

Portanto, o cultivo *in vitro* torna-se uma alternativa aos métodos tradicionalmente utilizados, tendo em vista que permite a propagação de plantas uniformes e em larga escala, mantendo o controle fitossanitário (FARIDAH et al., 2011; YUNUS et al., 2012).

2.2. MICROPROPAÇÃO

A reprodução assexuada nos vegetais ocorre por meio da propagação vegetativa, com a qual a técnica de cultura de tecidos está diretamente relacionada. Esta técnica, também conhecida como micropropagação, se fundamenta no princípio da totipotencialidade das células, o qual implica na capacidade que estas possuem de gerar uma nova planta e, mesmo maduras e diferenciadas, podem retornar ao estado meristemático. A cultura de tecidos, portanto, é uma oportunidade para se explorar esta capacidade celular, além de possibilitar o entendimento dos fatores envolvidos na diferenciação de células e tecidos (BHOJWANI; RAZDAN, 1996).

As vantagens da utilização da cultura de tecidos vegetais são: obtenção rápida de material vegetal, plantas livres de patógenos, conservação de germoplasma e de plantas ameaçadas de extinção, manipulação genética e

produção de metabólitos secundários; além de ser adequada para multiplicação de clones com alto valor agregado (KAPOOR; SHARMA; BHATNAGAR, 2008; ROUT; MOHAPATRA; JAIN, 2006). Assim, a utilização da micropropagação em larga escala para multiplicação de plantas permite redução de custos de produção, a partir de práticas que geram micropropágulos e produção de plantas mantendo a qualidade do produto.

Existem várias estruturas vegetais possíveis de serem utilizadas como material base para a micropropagação, cuja escolha é feita em função de fatores como disponibilidade de material, nível de contaminação, juvenilidade do tecido e estações do ano. Assim, qualquer parte isolada da planta destinada a esse fim é denominada explante, podendo ser, entre outras, fragmentos de raízes, hipocótilos, epicótilos, cotilédones, flores, folhas, grãos de pólen, embriões, óvulos, nós e gemas axilares ou apicais (CID; TEIXEIRA, 2010).

O processo de cultivo *in vitro* segue as seguintes etapas: inicialmente é feita a seleção de explantes, desinfestação e cultivo em meio nutritivo com controle fitossanitário; segue-se a fase de multiplicação dos propágulos por meio de subcultivos em meio específico para essa etapa. E, após a multiplicação, as partes aéreas produzidas são transferidas para meio de enraizamento e posteriormente as plântulas são transplantadas para substrato ou solo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Contudo, a ordem dessas etapas não precisa ser rigorosamente seguida, além de ser possível suprimir a fase de enraizamento, a depender do objetivo do pesquisador ou da empresa.

A condução do cultivo *in vitro* pode ser realizada de três formas, em função do tipo de explante e sua posterior manipulação: multiplicação através da proliferação de gemas axilares, por meio da indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta (passando pela fase de calo), ou através de embriogênese somática (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). De acordo com Pati et al. (2006) a técnica mais importante na micropropagação é a proliferação meristemática, a partir da qual se cultivam gemas apicais e segmentos nodais para regeneração de novos tecidos.

2.2.1. Cultivo *in vitro* de Plantas Ornamentais

De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), Morel (1960) foi o primeiro a utilizar a propagação *in vitro* para fins comerciais, o qual multiplicou orquídeas a partir do cultivo de ápices caulinares e regeneração de protocormos. A micropropagação tem sido frequentemente empregada na produção de mudas de plantas ornamentais, das quais cerca de 160 gêneros são mundialmente propagados *in vitro* em laboratórios comerciais (ROUT; MOHAPATRA; JAIN, 2006).

Resultados satisfatórios mostrando a eficiência do método de propagação *in vitro* foram alcançados para diversas plantas de interesse ornamental, como *Anoectochilus roxburghii* (ZHANG et al., 2015), *Primulina dryas* (PADMANABHAN et al., 2015), *Ipomoea sepiaria* (CHERUVATHUR; ABRAHAM; THOMAS, 2015), *Morus alba* (AROONPONG; CHANG, 2015), entre outras.

Diversos estudos também têm sido realizados com o intuito de se estabelecer protocolos de produção *in vitro* de mudas de plantas tropicais com diversos objetivos, tendo em vista que os métodos tradicionais dificultam a propagação dessas plantas em larga escala e com qualidade comercial. Assim, a micropropagação tem possibilitado a produção com alta e rápida taxa de reprodução e plantas com qualidade fitossanitária, como é caso de espécies das famílias Zingiberaceae (FARIDAH et al., 2011), Orchidaceae (ZHANG et al., 2015), Agavaceae (ASLAM; MUJIB; SHARMA, 2013), Agapanthaceae (BASKARAN; VAN STADEN, 2013), Iridaceae (SWART et al., 2012), entre outras. Para *Anthurium* spp., por exemplo, o cultivo *in vitro* já está bem estabelecido (SILVA et al., 2015).

Para plantas dessa família, o método convencional de propagação é via rizoma, o qual tem causado baixa eficiência e proliferação de doenças, e diversos estudos também têm demonstrado a eficiência do cultivo *in vitro* de plantas dessa família, tais como *Zingiber officinale* (BAISHEY, 2014; SERAN, 2013), *Zingiber zerumbet* (FARIDAH et al., 2011), *Kaempferia galanga* (PARIDA et al., 2010) e *Zingiber petiolatum* (PRATHANTURARUG et al., 2004). Para bastão do imperador (*Etilingera elatior*) poucos estudos foram realizados, porém são evidentes os benefícios da utilização da micropropagação nesta espécie, a exemplo de estabelecimento de protocolos para período de subcultivos (SANTOS et al., 2016) e uso como ferramenta para propagação comercial e melhoramento genético (YUNUS

et al., 2012), além de conservação e produção em larga escala da espécie (ABDELMAGEED et al., 2011; RESCAROLLI; ZAFFARI, 2009).

2.2.2. Hormônios/Reguladores de Crescimento Vegetais

Os hormônios vegetais (HV), ou fitohormônios, são “mensageiros químicos”, responsáveis por diversos processos fisiológicos nas plantas, como indução de raízes e brotos, alongamento de entrenós, produção de biomassa, entre outros. Assim, os principais tipos de hormônios envolvidos na regulação do desenvolvimento vegetal são: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, ácido abscísico e brassinosteróides (TAIZ; ZEIGER, 2009). Outras moléculas também possuem efeito similar ao dos hormônios vegetais, são os reguladores de crescimento (RC), cuja diferença básica é que os primeiros são produzidos naturalmente pelas plantas e os RC são sintéticos (CID; TEIXEIRA, 2010).

A utilização de HV ou RC tem viabilizado a otimização da técnica de cultura de tecido, tendo em vista suas funções nas plantas, os quais estão entre os principais fatores que podem influenciar o cultivo *in vitro* de plantas, a saber: meio de cultivo, genótipo, tipo de explante e iluminação (SILVA et al., 2015). Neste sentido, estudos têm sido realizados no intuito de se estabelecer protocolos de produção *in vitro* de plantas a partir da suplementação dos meios de cultura com essas substâncias, sendo as auxinas e citocininas o grupo utilizado com maior frequência na cultura de tecidos (CID; TEIXEIRA, 2010). De acordo com Taiz e Zeiger (2009), estas duas substâncias são imprescindíveis para o desenvolvimento vegetal, cuja ausência na planta é letal, pois são necessárias para a viabilidade; ambas estão relacionadas com a regulação do ciclo vegetal e são fundamentais para a divisão celular, além de determinarem, respectivamente, a diferenciação em raiz e gemas de tecidos vegetais cultivados.

Destacam-se como exemplos de auxinas: ácido indol-3-acético (AIA), a mais comum nos vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2009), ácido 1- α -naftalenoacético - ANA), ácido 3-indolbutírico (AIB), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-picolínico (picloran). São exemplos de citocininas naturais, a zeatina (ZEA) e o isopentenil adenina (IPA), destacando-se como naturais a 6-benzilaminopurina (BAP) e 6-furfurilaminopurina, conhecida como cinetina (CIN) (CID; TEIXEIRA, 2010).

Esses dois tipos de fitohormônios podem atuar juntos ou isoladamente na produção *in vitro* das plantas. Por exemplo, Zhang et al. (2015) constataram, em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), efeito sinérgico de auxina (0,5 mg/L de ANA) e citocininas (3,0 mg/L BAP e 1,0 mg/L CIN) sobre a produção e crescimento de brotos de *A. roxburghii*, para a qual maiores médias no enraizamento puderam ser obtidas com a combinação das auxinas ANA (0,6 mg/L), AIB (0,3 mg/L) e homogenato de banana (100 mg/L). Além disso, conforme observado por Cheruvathur, Abraham e Thomas (2015), a combinação de BAP (3,0 mg/L) e ANA (0,5 mg/L) proporcionou maiores número de brotos e comprimento de brotos de *I. sepiaria*. Por outro lado, a aplicação isolada de AIB (2,0 mg/L) teve efeito sobre o enraizamento dessa espécie, com maior número de raízes/broto; e o florescimento ótimo foi alcançado em meio MS suplementado com 3,0 mg/L de BAP, 0,5 mg/L de ANA e 2,0 mg/L de ABA (ácido abscísico).

Para plantas da família Zingiberaceae, os trabalhos realizados com RC têm produzido protocolos, evidenciando o efeito da utilização isolada e sinérgica de auxinas e citocininas sobre a produção de brotos e enraizamento. É possível regenerar, em média de 3-5 brotos por explante de *Z. officinale* em meio MS suplementado com 1,0 – 3,0 mg/L de BAP (IBRAHIM; KHALID; HUSSIN, 2007); enquanto que para a formação de calos dessa espécie a aplicação de auxina (ácido acético 2,4diclorofenoxi – 2,4D) foi imprescindível, cuja adição de 1,0 mg/L associada a 0,5 mg/L de BAP resultou em maior número, percentual e biomassa de calos formados (EL-NABARAWY et al., 2015).

Trabalhos também têm sido realizados com *E. elatior* e os resultados evidenciam o efeito significativo de auxinas e citocininas sobre as taxas de multiplicação, crescimento e enraizamento de plântulas *in vitro*. Dentre estes, Colombo et al. (2010) constataram que a melhor combinação de BAP e AIA para obtenção de brotos dessa planta, na fase de isolamento, foi 4,95 mg/L e 0,87 mg/L, respectivamente. Por outro lado, Yunus et al. (2012), estudando diferentes tipos de citocininas na multiplicação de brotos dessa espécie, constataram que BAP foi a mais responsiva, comparada com cinetina e 2-isopentenladenina (2-iP). Estes autores recomendaram, ainda, o enraizamento de brotos dessa planta em meio livre de RC, visto que as auxinas testadas (AIB e ANA) não apresentaram efeito significativo diferente do tratamento controle (sem RC) para esta etapa do cultivo *in vitro*.

2.2.3. Aclimatização

Uma das etapas do processo de cultivo *in vitro* é a aclimatização (ou aclimatação), sendo esta uma transição de uma condição em que a planta tem todos os recursos necessários para o seu crescimento disponíveis, em ambiente controlado, para um meio em que condições ambientais adversas passam a influenciar o desenvolvimento da planta, preparando-a para um futuro cultivo em campo de produção. A aclimatização, portanto, deve garantir a sobrevivência após o transplante e qualidade das plantas (SILVA et al., 2015). Essas características são essenciais para o sucesso da produção em larga escala via micropropagação (ZHANG et al., 2015).

O substrato de cultivo nesta fase é um dos fatores que influencia o sucesso da produção das mudas. Yunus et al. (2012) observaram que plantas de *E. elatior* apresentaram melhor performance na aclimatização quanto à taxa de sobrevivência e altura quando cultivadas em substrato à base de solo:areia: turfa de musgo (1:1:1), o que possibilitou também o desenvolvimento de plantas sem anomalias na sua morfologia. Abdelmageed et al. (2011) também obtiveram resultados satisfatórios na aclimatização dessa espécie em substrato esterilizado à base de solo com turfa de musgo, os quais observaram taxa de sobrevivência de 75% e desenvolvimento normal das plantas.

Contudo, o cultivo *in vitro* de plantas propicia a produção de plantas isentas de micro-organismos, incluindo os benéficos ao desenvolvimento das plantas, a exemplo dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Estes fungos merecem destaque por serem eficientes em aumentar o desenvolvimento das plantas, a absorção de nutrientes, o sucesso no estabelecimento em campo e a mitigação dos estresses bióticos e abióticos (SMITH; READ, 2008).

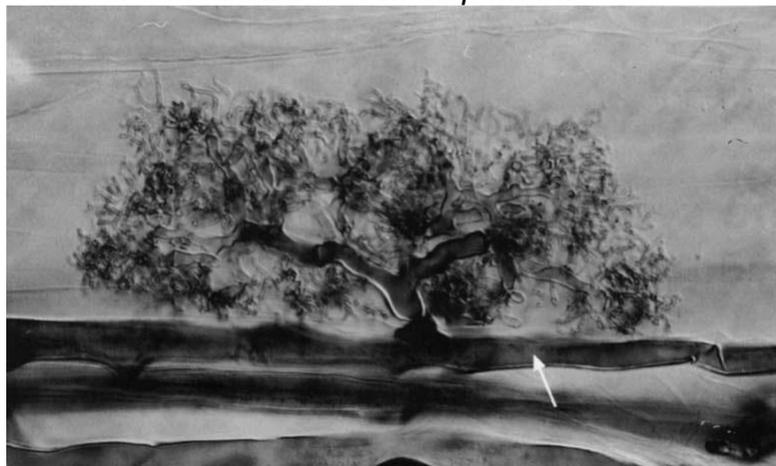
Estudos recentes têm mostrado a ocorrência generalizada de FMA em espécies de plantas da família Zingiberaceae (UMA et al., 2010) e que estes fungos promovem maior altura e produção de biomassa nestas plantas, podendo sua utilização substituir ou reduzir a aplicação de fertilizantes fosfatados durante a produção de mudas de *Z. officinale* (SILVA et al., 2008). Dessa forma, os FMA podem ser utilizados na fase de aclimatação de plantas, visando garantir maior sobrevivência e melhor desenvolvimento das plântulas micropropagadas.

2.3. FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

Uma das simbioses mais antigas e bem estabelecidas é a chamada 'micorriza'. Este termo se refere à associação mutualista formada entre os fungos micorrízicos e as raízes, em que o fungo passa a integrar o sistema radicular. A micorriza do tipo arbuscular (MA) é formada por fungos do filo Glomeromycota (SCHÜBLER; SCHWARZOTT; WALKER, 2001) e constitui o tipo mais comum de micorriza, os quais se associam a cerca de 90% das espécies de plantas terrestres e apresentam ampla ocorrência geográfica, sendo mais comumente encontrados nos trópicos (SMITH; READ, 2008). Neste sentido, afirma-se que a condição de planta não micorrizada deve ser entendida como exceção para a maioria das espécies vegetais (SMITH; SMITH, 2012).

Os FMA são biotróficos obrigatórios e colonizam a planta por meio de suas hifas que, após se estenderem através das células do córtex radicular, ramificam-se intensamente no interior destas células e formam uma estrutura típica que define a MA, o arbúsculo (Figura 1), além de outras estruturas alocadas dentro ou entre essas células que, juntas, determinam a efetividade da simbiose (SMITH; READ, 2008).

Figura 1 – Arbúsculo formado por *Glomus mosseae* (= *Funneliformis mosseae*) dentro de células do córtex radicular de *Allium porrum*.



FONTE: Smith e Read (2008).

A associação micorrízica está baseada na transferência de nutrientes por ambos os simbiontes, em que a planta fornece C orgânico e o fungo, nutrientes do solo, principalmente P, mas também K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn e N (KAPOOR;

SHARMA; BHATNAGAR, 2008; SMITH; SMITH, 2011a, 2011b). Assim, a formação dos arbúsculos mostra a efetividade da colonização radicular pelo fungo, visto que são as estruturas responsáveis pela troca de nutrientes (SMITH; SMITH, 2011b). Além disso, a simbiose MA pode ser considerada o componente mais metabolicamente ativo do órgão de absorção de plantas hospedeiras, as quais são fonte orgânica de nutrientes para o fungo e constituem um ambiente ecológico de proteção (AZCÓN-AGUILAR; BAREA, 1997).

Portanto, os FMA desempenham um papel fundamental na nutrição vegetal por se estenderem através de suas hifas e explorarem o solo, podendo atingir extensões muito maiores do que as raízes das plantas associadas e aumentando, portanto, a chance de estas adquirirem nutrientes e água do solo (SMITH; SMITH, 2011b), o que pode ser observado através da maior eficiência na absorção de nutrientes por raízes de plantas micorrizadas e no aumento da quantidade desses nutrientes em sua biomassa. Através do micélio externo estes fungos absorvem nutrientes imóveis do solo e os translocam rapidamente para as plantas, pois suas hifas penetram locais da fração lábil do solo que as raízes não alcançam (SMITH; READ, 2008).

A absorção de nutrientes pelas plantas pode se dar através do contato direto das raízes com solo (via direta), ou através do micélio dos fungos micorrízicos (via micorrízica). Assim, de forma geral, a última via é mais eficiente devido à capacidade de extensão das hifas dos FMA pelo solo, as quais podem se estender até 40 vezes mais do que a raiz (GIOVANNETTI et al., 2001). Esta via também é um sistema altamente regulado e de transferência rápida, enquanto que a absorção direta requer o contato imediato da raiz com a fração do solo (SMITH; SMITH, 2011b).

Estes fungos desempenham papéis fundamentais no ecossistema, associados com efeitos desde a estruturação e agregação do solo à superação das plantas a diversas condições de estresse; além de influenciarem indiretamente a produção e transporte de gases de efeito estufa no solo e reduzirem a emissão de N_2O , um importante gás de efeito estufa, sugerindo também um papel como mitigador de mudanças climáticas (BERRUTI et al., 2016). Estes fungos têm beneficiado as plantas em diversos aspectos, como: tolerância contra ataque de patógenos do solo (ANJOS et al., 2010; CAMPOS et al., 2013; MAIA; SILVEIRA; CAVALCANTE, 2006) e deficiência hídrica (KIVLIN; EMERY; RUDGERS, 2013); otimização da eficiência do uso da água na produção vegetal (OMIROU;

IOANNIDES; EHALIOTIS, 2013); redução do efeito de salinização do solo (YANO-MELO; SAGGIN; MAIA, 2003; YANO-MELO; TRUFEM; MAIA, 2003); produção de mudas, aperfeiçoando o desenvolvimento vegetal, principalmente após o transplântio (POUYÚ-ROJAS; SIQUEIRA, 2000); e melhoria da estrutura do solo (RILLIG, 2004), beneficiando a qualidade edáfica (CARAVACA et al., 2005) e a diversidade vegetal (BEVER, 2003).

Segundo Smith; Smith (2011a), a pesquisa com FMA tem sido atualmente aplicada com mais ênfase nos ecossistemas naturais, e, no passado, as plantas de interesse agrônômico ganharam maior atenção; o que pode ser decorrente, de acordo com os autores, do fato de não se considerar os FMA componentes integrais do sistema radicular destas plantas, como o faz nas plantas nativas. Apesar disso, os FMA são viáveis para serem utilizados como ferramenta biotecnológica, principalmente em culturas que passam por fase de formação de mudas e transplântio, como aquelas da horticultura em que as plantas são cultivadas em viveiros, vasos ou cultura de tecidos (AZCÓN-AGUILAR; BAREA, 1997).

2.4. MICORRIZA ARBUSCULAR NA HORTICULTURA

Quando submetidas às condições ambientais adversas durante a fase de aclimatização, plantas advindas de cultivo *in vitro*, as quais são mantidas sob rigoroso controle ambiental (como intensidade luminosa, umidade, temperatura, disponibilidade de nutrientes), podem não ser capazes de suportar tais condições e, portanto, terem sua eficiência fotossintética afetada de tal modo a prejudicar o seu desenvolvimento (KAPOOR; SHARMA; BHATNAGAR, 2008).

Dessa forma, estudos têm demonstrado o efeito do uso de FMA no estabelecimento de plantas micropropagadas na horticultura, podendo haver redução do impacto do transplântio, garantindo o sucesso do estabelecimento dessas plantas. Há décadas já se conhecem os benefícios dos FMA na horticultura, os quais exercem influência sobre várias espécies de plantas de importância agrícola; e estudos realizados sob condições controladas têm mostrado o favorecimento desses fungos às plantas em vários aspectos do seu crescimento e desenvolvimento (KOLTAI, 2010; ROUPHAEL et al., 2015).

Como revisado por Kapoor, Sharma e Bhatnagar (2008), a inoculação micorrízica *in vitro* é fundamental para o desenvolvimento de plantas

micropropagadas, porém, apesar das vantagens, esse método apresenta alguns entraves para o estabelecimento da simbiose e para a aplicação comercial do inóculo produzido via sistema de cultivo *in vitro* (ROUPHAEL et al., 2015). Por isso, como alternativa, as plantas geralmente são inoculadas quando são submetidas à fase de cultivo *ex vitro*. Assim, é possível associar duas ferramentas biotecnológicas para obtenção de plantas com alto valor agregado e garantindo uma produção mais sustentável na horticultura: a micropropagação e a simbiose micorrízica (CAMPANELLI et al., 2014).

Os benefícios da inoculação micorrízica sobre o desempenho dessas plantas na fase de aclimatização são diversos, visto que os FMA estão envolvidos em: desenvolvimento de um sistema radicular superior; aumento na eficiência da fotossíntese, em que a simbiose permite maiores taxas fotossintéticas, estoque e liberação de fotossintatos ao mesmo tempo, e hídrica; melhoria na absorção de nutrientes; proteção contra ataques de patógenos do solo; e mitigação de estresses ambientais, como seca, metais pesados, salinidade, entre outros (BAREA, 2015; KAPOOR; SHARMA; BHATNAGAR, 2008; ROUPHAEL et al., 2015; SMITH; READ, 2008).

Portanto, os FMA garantem maior tolerância de plantas micropropagadas às condições adversas enfrentadas durante a fase de aclimatização. Além disso, a inoculação das plantas antes do transplante para o campo implica em diversas vantagens para associação, principalmente na garantia de um contato imediato e bem estabelecido entre fungo-hospedeiro tendo em vista que a presença de raiz é necessária para que haja a colonização pelo fungo (KOLTAI, 2010).

Como as demandas na floricultura são baseadas em tendência, de acordo com a preferência do consumidor, há, a cada ano, uma gama de novas variedades e produtos surgindo. Portanto, é necessário adaptar o uso de FMA para cada espécie e cultivares que são demandados, principalmente em virtude de seus diferentes materiais de propagação e manejo das culturas; além da possibilidade de serem observados diferentes efeitos dos FMA em cada espécie individualmente, o que pode variar conforme característica do fungo e/ou hospedeiro vegetal (KOLTAI, 2010; SMITH; SMITH, 2011b).

Neste sentido, apesar da interação fungo-planta hospedeira não ser específica, pode haver uma relação de preferência frente a uma diversidade funcional observada na simbiose micorrízica, em que os FMA diferem na sua

compatibilidade com o hospedeiro e eficiência em melhorar o crescimento e o conteúdo nutricional da planta (NOVAIS et al., 2014). Por exemplo, Campanelli et al. (2014) observaram que *Glomus viscosum* (= *Viscospora viscosa*) apresentou maior afinidade com plantas micropropagadas de alcachofra do que *Glomus intraradices* (= *Rhizoglomus intraradices*), com o qual as plantas apresentaram maior desempenho no estabelecimento *ex vitro*. De outro modo, Burleigh, Cavagnaro e Jakobsen (2002) estudaram a diversidade funcional de sete espécies de FMA e observaram que *Medicago truncatula* foi mais responsiva à micorrização do que *Lycopersicon esculentum*; além disso, também foi observada diferença funcional entre os fungos estudados na mesma planta, com destaque para *G. intraradices* e *Glomus claroideum* (= *Claroideoglomus claroideum*). A diversidade funcional observada por estes autores permitiu constatar que o genótipo da planta desempenha papel fundamental na influência da efetividade do FMA sobre seu hospedeiro, o que pode ocorrer tanto a nível fisiológico quanto molecular.

Segundo Smith, Grace e Smith (2009), a escolha do fungo a ser inoculado está relacionada à resposta do crescimento vegetal à micorrização. A combinação de fungo-hospedeiro-substrato compatível é critério essencial nessa seleção para a máxima obtenção dos benefícios oriundos da inoculação micorrízica (AZCÓN-AGUILAR; BAREA, 1997; TRINDADE; LINS; MAIA, 2003). Assim, o tipo de substrato utilizado pode modular o efeito do FMA sobre a resposta da planta à simbiose, como observado em mudas micropropagadas de bananeira inoculadas com *Gigaspora margarita* e cultivadas em diferentes tipos de substratos (TRINDADE; LINS; MAIA, 2003). Por outro lado, a dose do substrato utilizada pode contribuir para inibição do estabelecimento da micorriza, o que foi constatado por Silva et al. (2006) na aclimatização de *Alpinia purpurata* e *Zingiber spectabile* inoculadas com *Gigaspora albida*, *Claroideoglomus etunicatum* e *Acaulospora longula* em substrato contendo vermicomposto.

Na horticultura é comum a utilização de substratos livres de micro-organismos para propagação e crescimento das plantas. Esses substratos usados em substituição ao solo são livres também de micro-organismos benéficos como os FMA, sendo necessária a introdução de inóculos desses fungos, visto que apresentam efeito comprovado para espécies cultivadas, podendo assim contribuir para o aperfeiçoamento da produção vegetal (ROUPHAEL et al., 2015). Além disso, como o cultivo de plantas ornamentais geralmente é feito em vasos, apesar do custo

elevado para sua produção, a aplicação de FMA é viável e, o benefício é garantido, sendo, portanto, a sua utilização sustentável para a floricultura (KOLTAI, 2010).

O benefício da inoculação de FMA em plantas micropropagadas na horticultura tem sido comprovado para diversos hospedeiros, como por exemplo: *Gerbera* sp. (SIQUEIRA; FÁTIMA; BLANK, 1999), *Gloriosa superba* (YADAV; AGGARWAL; SINGH, 2013), *Cynara cardunculus* (CAMPANELLI et al., 2014), *Musa* spp. (KOFFI; DECLERCK, 2015; MWANGI et al., 2013; YANO-MELO et al., 1999), três cultivares de *Paeonia* (WEN et al., 2016), entre outras. Contudo, poucos trabalhos relacionam o efeito desses fungos sobre o cultivo *ex vitro* de plantas da família Zingiberaceae após micropropagadas, em que foram encontrados até o momento apenas os trabalhos de Miachir et al. (2004) com *Curcuma zedoaria*, Silva et al. (2006) com *Alpinia purpurata* e *Zingiber spectabile*, Santos et al. (2010) e Silva et al. (2008) com *Z. officinale* e Oliveira et al. (2010) com *Z. spectabile*. E, não há registros de trabalhos com plantas micropropagadas de *E. elatior* inoculadas com FMA.

Os FMA também podem ser utilizados no manejo da adubação das plantas, promovendo aumento da disponibilidade de P e K (SUBHASHINI, 2016) e auxiliando as plantas na absorção de macro e micronutrientes (BERRUTI et al., 2016). Além disso, plantas micorrizadas podem acessar P com baixa disponibilidade no solo com maior eficiência em relação àquelas sem micorriza (SMITH et al., 2011).

No entanto, o P em níveis elevados pode inibir a associação micorrízica (BALZERGUE et al., 2013; SMITH; SMITH, 2011b). Estudos mais recentes têm revelado que há interação entre os nutrientes P e N na regulação da simbiose, podendo haver efeito inibitório dessa associação mediante aplicação destes nutrientes em níveis elevados (BONNEAU et al., 2013). Porém, a aplicação de P com outros nutrientes pode reduzir o seu efeito inibitório, como observado por Nouri et al. (2014) em plantas de *Petunia hybrida* inoculadas ou não com *Rhizophagus irregularis*.

Neste sentido, confirma-se a importância do uso dos FMA como ferramenta biotecnológica para produção sustentável de mudas com qualidade e potencial de produção em larga escala, visando a obtenção de material vegetal que possa ser recomendado para sua implantação e produção em condições de campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELMAGEED, A. H. A. et al. Micropropagation of *Etilingera elatior* (Zingiberaceae) by using axillary bud explants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 18, p. 4465–4469, 2011.
- ABDELWAHAB, S. I. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of the essential oils of *Etilingera elatior* and *Cinnamomum pubescens* Kochummen. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 15, p. 2682–2688, 2010.
- ANJOS, É. C. T. et al. Interactions between an arbuscular Mycorrhizal fungus (*Scutellospora heterogama*) and the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on sweet passion fruit (*Passiflora alata*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 4, p. 801–809, 2010.
- AROONPONG, P.; CHANG, J. C. Micropropagation of a difficult-to-root weeping mulberry (*Morus alba* var. Shidareguwa): A popular variety for ornamental purposes. **Scientia Horticulturae**, v. 194, p. 320–326, 2015.
- ARYA, V.; KUMAR, D.; GAUTAM, M. Phytopharmacological review on flowers: Source of inspiration for drug discovery. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 4, n. 1, p. 45–51, 2014.
- ASLAM, J.; MUJIB, A.; SHARMA, M. P. In vitro micropropagation of *Dracaena sanderiana* Sander ex Mast: An important indoor ornamental plant. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 20, n. 1, p. 63–68, 2013.
- ASSIS, A. M. et al. Aclimatização de bastão-do-imperador (*Etilingera elatior*) em substratos à base de coco. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 1, p. 43–47, 2009.
- AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J. M. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: Significance and potentials. **Scientia Horticulturae**, v. 68, n. 1–4, p. 1–24, 1997.
- BAISHEY, R. Induction of in vitro microrhizomes using silver nitrate in *Zingiber officinale*. v. 13, n. April, p. 256–262, 2014.
- BAREA, J. M. Future challenges and perspectives for applying microbial biotechnology in sustainable agriculture based on a better understanding of plant-microbiome interactions. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 15, n. 2, p. 261–282, 2015.
- BASKARAN, P.; VAN STADEN, J. Rapid in vitro micropropagation of *Agapanthus praecox*. **South African Journal of Botany**, v. 86, p. 46–50, 2013.
- BERRUTI, A. et al. Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Natural Biofertilizers: Let's Benefit from Past Successes. **Frontiers in Microbiology**, v.6, n. 1559, p. 1–13, 2016.
- BEVER, J. D. Soil community feedback and the coexistence of competitors: Conceptual frameworks and empirical tests. **New Phytologist**, v. 157, p. 465–473, 2003.
- BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. Cellular Totipotency. In: BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. (Eds.). **Plant Tissue Culture - Theory and Practice, a Revised Edition**. Studies in Plant Science. 1st. ed. [s.l.] Elsevier, 1996. v. 5p. 95–123.
- BONNEAU, L. et al. Combined phosphate and nitrogen limitation generates a nutrient stress transcriptome favorable for arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Medicago truncatula*. **New Phytologist**, v. 199, p. 188–202, 2013.
- BRAINER, M. S. C. P.; OLIVEIRA, A. A. P. **Floricultura: perfil da atividade no nordeste brasileiro**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2007.
- BURLEIGH, S. H.; CAVAGNARO, T.; JAKOBSEN, I. Functional diversity of arbuscular mycorrhizas extends to the expression of plant genes involved in P nutrition. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 374, p. 1593–1601, 2002.
- CAMPANELLI, A. et al. Effectiveness of mycorrhizal fungi on globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. scolymus) micropropagation. **Journal of Plant Interactions**, v. 9, n. 1, p. 100–106, 2014.
- CAMPOS, M. A. DA S. et al. Responses of guava plants to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi in soil infested with *Meloidogyne enterolobii*. **Plant Pathology Journal**, v. 29, n. 3, p. 242–248, 2013.
- CARAVACA, F. et al. Survival of inocula and native AM fungi species associated with shrubs in a degraded Mediterranean ecosystem. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 227–

233, 2005.

CHAN, E. W. C. et al. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. **Food Chemistry**, v. 109, n. 3, p. 477–483, 2008.

CHAN, E. W. C. et al. Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. **Food Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 166–172, 2009.

CHAN, E. W. C.; LIM, Y. Y.; OMAR, M. Antioxidant and antibacterial activity of leaves of *Etilingera* species (Zingiberaceae) in Peninsular Malaysia. **Food Chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1586–1593, 2007.

CHAN, E. W. C.; LIM, Y. Y.; TAN, S. P. Standardised herbal extract of chlorogenic acid from leaves of *Etilingera elatior* (Zingiberaceae). **Pharmacognosy research**, v. 3, n. 3, p. 178–184, 2011.

CHAN, E. W. C., LIM, Y. Y., WONG, S. K. Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Etilingera elatior*: A Review. **Pharmacognosy Journal**, v. 3, n. 22, p. 6–10, 2011.

CHERUVATHUR, M. K.; ABRAHAM, J.; THOMAS, T. D. *In vitro* micropropagation and flowering in *Ipomoea sepiaria* Roxb. An important ethanomedicinal plant. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 4, n. 1, p. 49–53, 2015.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. 1ª. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p. 15–49.

COLOMBO, L. A. et al. Estabelecimento de protocolo para multiplicação *in vitro* de Bastão-do-imperador (*Etilingera elatior*) Jack RM Sm. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 4, p. 695–700, 2010.

COSTA, M. R. T. DA R. et al. Caracterização Genética de Bastão do Imperador por Marcadores Moleculares RAPD. **Revista Sodebras**, v. 9, n. 101, p. 124–127, 2014.

EL-NABARAWY, M. A. et al. The effect of some factors on stimulating the growth and production of active substances in *Zingiber officinale* callus cultures. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 60, n. 1, p. 1–9, 2015.

ENCYCLOPÆDIA BRITANNICA. **Zingiberaceae**. Disponível em: <<http://academic-eb-britannica.ez21.periodicos.capes.gov.br/EBchecked/topic/657390/Zingiberaceae>>. Acesso em: 28 set. 2015.

FARIDAH, Q. Z. et al. Efficient *in vitro* regeneration of *Zingiber zerumbet* Smith (a valuable medicinal plant) plantlets from rhizome bud explants. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 46, p. 9303–9308, 2011.

GIOVANNETTI, M. et al. The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. **New Phytologist**, v. 151, n. 3, p. 717–724, 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. 1ª. ed. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ, 1998. v. 1p. 183–260.

HABSAH, M. et al. Antitumour-promoting and cytotoxic constituents of *Etilingera elatior*. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, v. 12, n. 1, p. 6–12, 2005.

HALEAGRAHARA, N. et al. Protective effects of *Etilingera elatior* extract on lead acetate-induced changes in oxidative biomarkers in bone marrow of rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 10, p. 2688–2694, 2010.

IBRAHIM, H., KHALID, N., HUSSIN, K. Cultivated gingers of peninsular malaysia: utilization, profiles and micropropagation. **Garden's Bulletin Singapore**, v. 59, n.1&2, p. 71-88, 2007.

JEEVANI OSADEE WIJEKOON, M. M.; KARIM, A. A.; BHAT, R. Evaluation of nutritional quality of torch ginger (*Etilingera elatior* Jack.) inflorescence. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 4, p. 1415–1420, 2011.

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

KIMLIN, S. N.; EMERY, S. M.; RUDGERS, J. A. Fungal symbionts alter plant responses to global change. **American Journal of Botany**, v. 100, n. 7, p. 1445–1457, 2013.

KOFFI, M. C.; DECLERCK, S. *In vitro* mycorrhization of banana (*Musa acuminata*) plantlets improves their growth during acclimatization. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**

- **Plant**, v. 51, n. 3, p. 265–273, 2015.
- KOLTAL, H. Mycorrhiza in floriculture: Difficulties and opportunities. **Symbiosis**, v. 52, n. 2-3, p. 55–63, 2010.
- LACHUMY, S. J. T. et al. Pharmacological activity, phytochemical analysis and toxicity of methanol extract of *Etilingera elatior* (torch ginger) flowers. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 10, p. 769–774, 2010.
- LAMAS, A. DA M. **Floricultura tropical: tecnologia de produção**. Tabatinga, AM, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000079&pid=S0103-8478201200120000800011&lng=pt>. Acesso em 06 dez. 2014.
- LIM, T. K. *Etilingera elatior*. In: LIM, T. K. (Ed.). **Edible Medicinal and Non Medicinal Plants**. 1. ed. [s.l.] Springer Netherlands, 2014. p.834–843.
- LOGES, V. et al. Colheita, pós-colheita e embalagem de flores tropicais em Pernambuco. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 699–702, 2005.
- LOGES, V. et al. Potencial de mercado de bastão-do-imperador e sorvetão. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 14, n. 1, p. 15–22, 2008.
- MAIA, L. C.; SILVEIRA, N. S. S. DA; CAVALCANTE, U. M. T. Interaction Between Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Root Pathogens. In: RAI, M. K. (Ed.). **Handbook of Microbial Biofertilizers**. New York: The Haworth Press, Inc., 2006. p. 325–352.
- MAIMULYANTI, A.; PRIHADI, A. R. Chemical Composition , Phytochemical and Antioxidant Activity from Extract of *Etilingera Elatior* Flower from Indonesia. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 3, n. 6, p. 233–238, 2015.
- MARCSIK, D. et al. Curcuma Crop Development and Improvement Part 1 - New Cultivars. **Horticulture Division**, n. 311, p. 80–83, 2003.
- MEIR, D. et al. Application of mycorrhizae to ornamental horticultural crops: lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) as a test case. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 8, p. 5–10, 2010.
- MIACHIR, J. I. et al. Micropropagation and callogenesis of *Curcuma zedoaria* Roscoe. **Scientia Agricola**, v. 61, n. 4, p. 427–432, 2004.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473–497, 1962.
- MWANGI, A. M. K. et al. Growth effects of microorganisms based commercial products inoculated to tissue cultured banana cultivated in three different soils in Kenya. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 152–162, 2013.
- NOURI, E. et al. Phosphorus and Nitrogen Regulate Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis in *Petunia hybrida*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, e90841, p. 1-14, 2014.
- NOVAIS, C. B. et al. Inter- and intraspecific functional variability of tropical arbuscular mycorrhizal fungi isolates colonizing corn plants. **Applied Soil Ecology**, v. 76, p. 78–86, 2014.
- OLIVEIRA, J. R. G. et al. Fungos micorrízicos arbusculares e rizobactérias promotoras de crescimento na aclimatização de *Zingiber spectabile*. **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 687–694, 2010.
- OLIVEIRA, J. R. G. et al. Acclimatization of *Tapeinochilos ananassae* plantlets in association with arbuscular mycorrhizal fungi. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 46, n. 9, p. 1099–1104, 2011.
- OMIROU, M.; IOANNIDES, I. M.; EHALIOTIS, C. Mycorrhizal inoculation affects arbuscular mycorrhizal diversity in watermelon roots, but leads to improved colonization and plant response under water stress only. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 112–119, 2013.
- PADMANABHAN, P. et al. Micropropagation of *Primulina dryas* (Dunn) Mich. Möller & A. Webber: High frequency regeneration from leaf explants. **Scientia Horticulturae**, v. 192, p. 250–255, 2015.
- PARIDA, R. et al. Rapid multiplication and *in vitro* production of leaf biomass in *Kaempferia galanga* through tissue culture. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 4, 2010.
- PATI, P. K. et al. *In vitro* propagation of rose - A review. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 1, p. 94–114, 2006.
- Transactions of British Mycological Society**, v. 55, p. 158–161, 1970.

- POUYÚ-ROJAS, E.; SIQUEIRA, J. O. Micorriza arbuscular e fertilização do solo no desenvolvimento pós-transplante de mudas de sete espécies florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 103–114, 2000.
- PRATHANTURARUG, S. et al. *In vitro* propagation of *Zingiber petiolatum* (Holtttum). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 40, n. 3, p. 317–320, 2004.
- RESCAROLLI, C. L. S.; ZAFFARI, G. R. Produção de mudas de *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Sm. através da cultura de tecidos vegetais *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 2, p. 190–195, 2009.
- RILLIG, M. C. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 84, n. 4, p. 355–363, 2004.
- RODRIGUES, V. G. S. Recomendações técnicas para a propagação de flores tropicais em Rondônia. **Embrapa Rondônia**, n. 328, p. 1–3, 2007.
- ROUPHAEL, Y. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi act as biostimulants in horticultural crops. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 91–108, 2015.
- ROUT, G. R.; MOHAPATRA, A.; JAIN, S. M. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 6, p. 531–560, 2006.
- SAKAI, S. et al. Variation in the strength of association among pollination systems and floral traits: Evolutionary changes in the floral traits of Bornean gingers (Zingiberaceae). **American Journal of Botany**, v. 100, n. 3, p. 546–555, 2013.
- SANTOS, E. M. et al. Aclimatização de mudas micropropagadas de bastão do imperador em diferentes volumes de recipientes. **Revista Ceres**, v. 60, n. 1, p. 134–137, 2013.
- SANTOS, E. O. et al. Multiplicação de bastão-do-imperador em resposta a concentrações de BAP e número de subcultivos. **Ornamental Horticulture**, v. 22, n. 1, p. 88-93, 2016.
- SANTOS, R. et al. Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Phosphorus Fertilization on *Post Vitro* Growth of Micropropagated *Zingiber officinale* Roscoe. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 765–771, 2010.
- SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p. 1413–1421, 2001.
- SERAN, T. H. *In vitro* Propagation of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) through Direct Organogenesis: A Review. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 24, p. 1826-1835, 2013.
- SILVA, J. A. T. et al. *Anthurium* in vitro: A review. **Scientia Horticulturae**, v. 186, p. 266–298, 2015.
- SILVA, M. A. et al. Fungos micorrízicos arbusculares e vermicomposto na aclimação de *Alpinia purpurata* (Viell.) Schum e *Zingiber spectabile* Griff. (Zingiberaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 2, p. 249–256, 2006.
- SILVA, M. F. et al. The effect of arbuscular mycorrhizal fungal isolates on the development and oleoresin production of micropropagated *Zingiber officinale*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 2, p. 119–130, 2008.
- SILVÉRIO, M. D. O.; CASTRO, C. F. S.; MIRANDA, A. R. Avaliação da atividade antioxidante e inibitória da tirosinase das folhas de *Dipteryx alata* Vogel (Baru). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 59–65, 2013.
- SIQUEIRA, O.; FÁTIMA, M. DE; BLANK, A. Fungos micorrízicos-arbusculares no desenvolvimento de mudas de helicônia e gérbera micropropagadas. p. 25–28, 1999.
- SIRIRUGSA, P. Thai Zingiberaceae: Species Diversity And Their Uses. **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 11, p. 23–27, 1999.
- SMITH, F. A.; GRACE, E. J.; SMITH, S. E. More than a carbon economy: nutrient trade and ecological sustainability in facultative arbuscular mycorrhizal symbioses. **New Phytologist**, v. 182, n. 2, p. 347–358, 2009.
- SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**. 3rd ed. New York, London: Academic Press, 2008. 794p.
- SMITH, F. A.; SMITH, S. E. What is the significance of the arbuscular mycorrhizal colonisation of many economically important crop plants? **Plant and Soil**, v. 348, n. 1-2, p.

63–79, 2011a.

SMITH, S. E.; SMITH, F. A. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. **Annual review of plant biology**, v. 62, p. 227–50, 2011b.

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

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática : guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

SUBHASHINI, D. V. Effect of NPK Fertilizers and Co-inoculation with Phosphate-solubilizing Arbuscular Mycorrhizal Fungus and Potassium-Mobilizing Bacteria on Growth, Yield, Nutrient Acquisition, and Quality of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Communications in soil science and plant analysis**, v. 47, n. 3, p. 328–337, 2016.

SWART, P. A. et al. Micropropagation of *Romulea sabulosa* Schltr. ex Beg. - A potential ornamental plant. **Scientia Horticulturae**, v. 135, p. 151–156, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TERAO, D.; CARVALHO, A. C. P. P.; BARROSO, T. C. DA S. F. **Flores Tropicais**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005.

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

UMA, E. et al. Mycorrhizal and dark septate fungal associations in gingers and spiral gingers. **Botany**, v. 88, p. 500–511, 2010.

UNEMOTO, L. K. et al. Cultivo de bastão-do-imperador sob diferentes espaçamentos em clima subtropical. **Ciência Rural**, v. 42, n. 12, p. 2153–2158, 2012.

WEN, S.-S. et al. Efficient protocols for the micropropagation of tree peony (*Paeonia suffruticosa* “Jin Pao Hong”, *P. suffruticosa* “Wu Long Peng Sheng”, and *P. xlemoinei* “High Noon”) and application of arbuscular mycorrhizal fungi to improve plantlet establishment. **Scientia Horticulturae**, v. 201, p. 10–17, 2016.

WONG, W. **Light up your Garden with a Torch Ginger**. Singapore Green Culture, Singapore, 2008. Disponível em: <<http://www.greenculturesg.com/archives.html>>. Acesso em 11 mar. 2015.

YADAV, K.; AGGARWAL, A.; SINGH, N. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) induced acclimatization, growth enhancement and colchicine content of micropropagated *Gloriosa superba* L. plantlets. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 88–93, 2013.

YANO-MELO, A. M. et al. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the acclimatization of micropropagated banana plantlets. **Mycorrhiza**, v. 9, n. 2, p. 119–123, 1999.

YANO-MELO, A. M.; SAGGIN, O. J.; MAIA, L. C. Tolerance of mycorrhized banana (*Musa* sp. cv. Pacovan) plantlets to saline stress. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 95, p. 343–348, 2003.

YANO-MELO, A. M.; TRUFEM, S. F. B.; MAIA, L. C. Arbuscular mycorrhizal fungi in salinized and surrounded areas at the São Francisco Submedium Valley, Brazil. **Hoehnea**, v. 30, n. 2, p. 79–87, 2003.

YUNUS, M. F. et al. *In vitro* propagation of *Etilingera elatior* (Jack) (torch ginger). **Scientia Horticulturae**, v. 135, p. 145–150, 2012.

YUNUS, M. F. et al. In vitro mutagenesis of *Etilingera elatior* (Jack) and early detection of mutation using RAPD markers. **Turkish Journal of Biology**, v. 37, n. 6, p. 716–725, 2013.

ZHANG, A. et al. Large scale in vitro propagation of *Anoectochilus roxburghii* for commercial application: Pharmaceutically important and ornamental plant. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 158–162, 2015.

3. Micropropagação e aclimatização de plântulas de *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith: uso de diferentes fitohormônios e substratos

Angélica Ricarte da Silva^a, Adriana Mayumi Yano-Melo^b, Nataniel Franklin de Melo^c

^a Laboratório de Microbiologia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, 56300-990, Petrolina, PE, Brazil. Email: angelica.ricarte@hotmail.com

^b Laboratório de Microbiologia, Colegiado Acadêmico de Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, 56300-990, Petrolina, Pernambuco, Brazil Email: amymelo17@hotmail.com

^c Laboratório de Biotecnologia, Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semiárido, Embrapa Semiárido, 56302-970, Petrolina, PE, Brazil. Email: nataniel.melo@embrapa.br

RESUMO

O bastão do imperador (*Etilingera elatior*) é uma espécie de clima tropical comumente propagada via rizomas, o que facilita a proliferação de doenças, reduzindo assim a eficiência no seu cultivo. Assim, o cultivo *in vitro* pode ser uma alternativa para a produção de mudas desta espécie. Objetivou-se, portanto, analisar o efeito da ação isolada e/ou combinada de BAP e AIB sobre a multiplicação *in vitro* e da composição do substrato sobre o estabelecimento na aclimatização desta espécie. Para isto, plântulas de *E. elatior* foram multiplicadas em meio de cultivo MS, suplementado com diferentes concentrações de BAP (0, 1,0, 2,0 e 4,0 mg/L) e AIB (0, 0,5, 1,0 e 2,0 mg/L), em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em arranjo fatorial 4 x 4 (doses de BAP X doses de AIB), com cinco repetições. As plantas foram aclimatizadas em substratos à base de areia:vermiculita (1:1 v/v) e areia:Plantmax[®] (2:1 v/v), em DIC, com 10 repetições. Houve sinergismo da citocinina (BAP) e auxina (AIB) adicionadas ao meio de cultivo e o BAP isoladamente promoveu maior produção de brotos e folhas. As plantas em aclimatização foram beneficiadas com o substrato à base de areia:vermiculita, no qual foi constatado 100% de sobrevivência. Concluiu-se, portanto, que a adição de 1,0 mg/L BAP ao meio de cultivo MS é suficiente para indução e multiplicação de brotos e produção de biomassa de *E. elatior* durante a micropropagação. Além disso, durante a aclimatização pode ser recomendada a utilização de substrato contendo areia:vermiculita (1:1 v/v), o qual se mostrou mais favorável para a sobrevivência e enraizamento das plantas nesta fase.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*, Zingiberaceae, regulador de crescimento vegetal, substrato.

3.1. Introdução

A família Zingiberaceae possui 52 gêneros e cerca de 1300 espécies descritas, destacando-se como uma das principais representantes de plantas tropicais (GÓMEZ-BETANCUR; BENJUMEA, 2014). Uma das espécies pertencentes a esta família é *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith, nativa do sudeste

da Ásia, encontrada na Malásia, Indonésia e sul da Tailândia (LIM, 2014) e conhecida no Brasil como Bastão do Imperador, Gengibre de Tocha e Flor da Redenção.

Estudos têm mostrado a importância desta espécie devido ao amplo espectro de utilidades, principalmente como fonte de alimentos, condimentos, óleos essenciais, planta ornamental, além de possuir propriedades medicinais como atividade antioxidante, antimicrobiana, entre outras propriedades farmacológicas (ARYA; KUMAR; GAUTAM, 2014; CHAN; LIM; WONG, 2011; LIM, 2014).

Esta planta tem sido cultivada em diversas regiões, sendo os principais países produtores: Filipinas, Tailândia, Jamaica, Estados Unidos (Havaí), Costa Rica e Equador (TERAO; CARVALHO; BARROSO, 2005). O Brasil, por sua vez, apresenta condições edafoclimáticas favoráveis ao cultivo das plantas tropicais.

No entanto, a expansão desse cultivo depende da disponibilidade de mudas saudáveis e devido ao seu principal método de propagação vegetativa ser por rizomas (TERAO; CARVALHO; BARROSO, 2005), a possibilidade de contaminação por patógenos é facilitada, servindo assim os rizomas como fonte de inóculo, em virtude da sua susceptibilidade a agentes fitopatogênicos (LINS; COELHO, 2004). Dessa forma, a micropropagação ou cultivo *in vitro* é uma ferramenta biotecnológica que pode ser utilizada como método alternativo de propagação vegetativa de *E. elatior*, de forma a promover a obtenção rápida de material vegetal, visando a conservação de germoplasma, produção de plantas livres de patógenos, manipulação genética e produção de metabólitos secundários; além de ser adequada para multiplicação de clones com alto valor agregado (ROUT; MOHAPATRA; JAIN, 2006).

A cultura de tecidos tem sido aperfeiçoada com a utilização de fitohormônios, que são substâncias bioquímicas responsáveis pela regulação do desenvolvimento vegetal, sendo as auxinas e citocininas essenciais. Portanto, sua utilização em meios de cultivo *in vitro* é fundamental, visando principalmente suprir as deficiências da produção endógena de hormônios no material isolado da planta matriz (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Contudo, ainda há lacunas no estudo da micropropagação de *E. elatior*, sendo necessária a ampliação dos conhecimentos a respeito do efeito de fitohormônios sobre o seu desenvolvimento *in vitro*. Assim, estudos têm sido realizados com esta espécie no sentido de se estabelecer protocolos de

micropropagação utilizando hormônios vegetais e entender o efeito destas substâncias sobre o desenvolvimento *in vitro* das plantas.

A aplicação isolada de citocininas como 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (CIN) e 2-isopenteniladenina (2 iP) foi testada para regeneração e produção de brotos, enquanto auxinas como ácido 3-indolacético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB) e ácido naftalenoacético (ANA) foram aplicadas isoladamente para a indução de raízes (ABDELMAGEED et al., 2011; SANTOS et al., 2016; YUNUS et al., 2012). Por outro lado, também tem sido constatado efeito sinérgico de citocininas e auxinas sobre o desenvolvimento de brotos de *E. elatior* (COLOMBO et al., 2010) e de outras espécies da mesma família, como *Zingiber zerumbet* (FARIDAH et al., 2011), o que não foi constatado para *Zingiber officinale*, que apresentou maior número de brotos quando foi adicionado apenas BAP ao meio de cultivo (ABBAS et al., 2011).

A aclimatização é umas das etapas da micropropagação que consiste na transição do cultivo da planta de uma condição em que esta possui todos os recursos necessários para o seu crescimento disponíveis, em ambiente controlado, para um meio em que condições ambientais adversas passam a influenciar o seu desenvolvimento, preparando-a para um futuro cultivo em campo de produção. A aclimatização, portanto, deve garantir a sobrevivência após o transplante e a qualidade das plantas (SILVA et al., 2015). Essas características são essenciais para o sucesso da produção em larga escala via micropropagação (ZHANG et al., 2015).

O substrato de cultivo nesta fase é um dos fatores que influencia o sucesso da produção das mudas. Yunus et al. (2012) observaram que plantas de *E. elatior* apresentaram melhor performance na aclimatização quanto à taxa de sobrevivência e altura quando cultivadas em substrato à base de solo:areia: turfa de musgo (1:1:1). Abdelmageed et al. (2011) também obtiveram resultados satisfatórios na aclimatização dessa espécie em substrato esterilizado à base de solo com turfa de musgo, os quais observaram taxa de sobrevivência de 75%.

Com base em estudos prévios, a hipótese do presente trabalho é que a aplicação conjunta de citocinina e auxina pode favorecer a produção de clones de *E. elatior* e que a composição do substrato pode influenciar a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas durante a fase de aclimatização. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da ação isolada e/ou combinada de BAP

e AIB sobre a multiplicação *in vitro* desta espécie e testar dois tipos de substrato, à base areia:vermiculita e de areia:Plantmax®, durante a sua aclimatização.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Obtenção de explantes

Inicialmente, plantas de *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith cv. Red Torch foram estabelecidas *in vitro*, multiplicadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 3% (p/v) de sacarose e solidificado com 0,45% de ágar e 2,0 mg/L de BAP para garantir culturas estoque. O material foi incubado a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) e intensidade luminosa em torno de $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os explantes foram obtidos a partir da excisão de cerca de 1 cm da porção basal entre o sistema radicular e o caule (Figura 1a), contendo meristemas caulinares dos brotos previamente cultivados *in vitro*, os quais foram utilizados no experimento de micropropagação.

3.2.2. Preparo de meio e condições de cultivo

O cultivo para a micropropagação de *E. elatior* consistiu da utilização do meio de cultura MS suplementado com 3% (p/v) de sacarose, 0,45% de ágar e diferentes concentrações de BAP (0, 1,0, 2,0 e 4,0 mg/L) e AIB (0, 0,5, 1,0 e 2,0 mg/L), com pH ajustado para 5,8. O meio de cultura foi distribuído em tubos de ensaio (15 mL, cada) antes de autoclavagem a 121 °C e 1,05 kgf/cm² durante 20 min. Os explantes foram inoculados nos meios de cultivo contendo ou não reguladores de crescimento e cultivados a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) e intensidade luminosa em torno de $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As culturas foram mantidas no mesmo meio por um período de 60 dias (Figura 1).

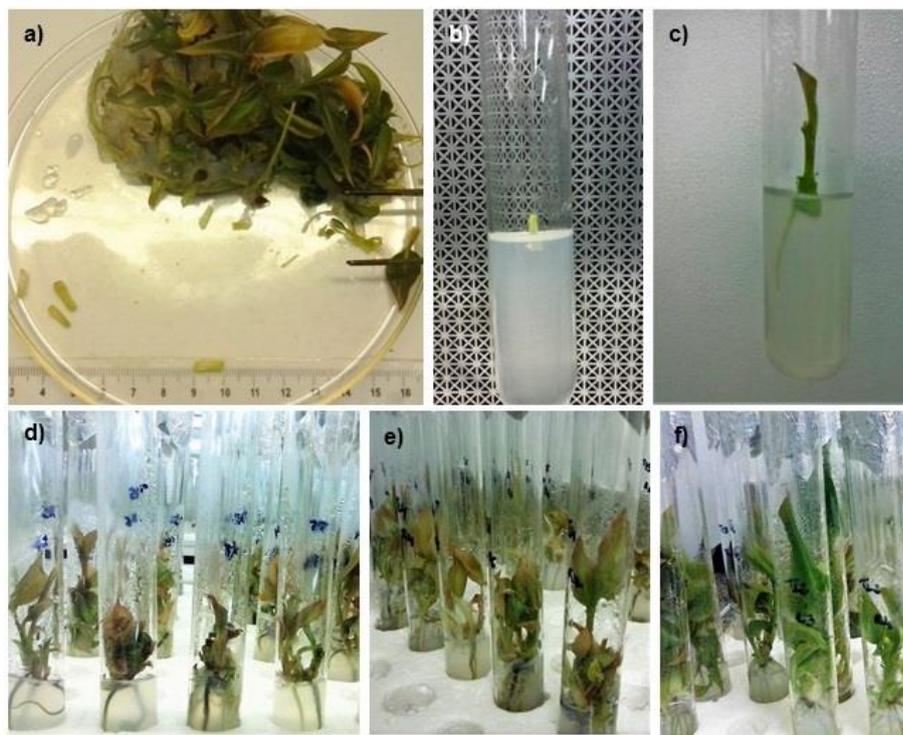


Figura 1 – Propagação *in vitro* de *Etilingera elatior*. **a)** explantes de 1 cm de comprimento. **b)** inoculação de explante em meio MS suplementado ou não com BAP e/ou AIB. **c - f)** crescimento e multiplicação de explantes até 60 dias de cultivo.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) considerando esquema fatorial 4x4 (4 doses de BAP e 4 doses de AIB), totalizando 16 combinações, em cinco repetições, contendo um explante por repetição. Após o período de cultivo, foram avaliadas as seguintes variáveis: Altura (mm), número de brotos (NB), de folhas (NF) e de raízes (NR) e comprimento da maior raiz (mm).

3.2.3. Aclimatização com diferentes tipos de substrato

Após o estabelecimento *in vitro*, foram selecionadas aleatoriamente plântulas a serem aclimatizadas em casa de vegetação, as quais foram retiradas dos tubos de ensaio, cujas raízes foram lavadas em água corrente para remover o excesso do meio de cultura. Foram então transplantadas para tubetes (125 mL) contendo dois tipos de substrato diferentes, a saber: areia:vermiculita (A:V; 1:1 v/v) e areia:Plantmax® (A:P; 2:1 v/v). O experimento foi conduzido durante 60 dias em DIC, com 10 repetições, contendo uma planta por repetição.

Os componentes dos substratos foram autoclavados a 121 °C e 1.05 kgf/cm² durante 1 h e mantidos em repouso por cerca de 20 dias, antes de serem misturados. Após o transplante para os tubetes as plântulas foram irrigadas

diariamente com água destilada e, a partir do 15^o dia de cultivo, uma vez por semana, os tubetes contendo A:V foram suplementados com solução nutritiva contendo sais MS com 50% de sua concentração. Aos 60 dias de cultivo as plantas foram avaliadas quanto ao percentual de sobrevivência, altura, número de folhas, biomassa fresca (BFA) e seca (BSA) da parte aérea e fresca radicular (BFR), relação entre diâmetro menor (DME) e maior (DMA) da base da haste e relação entre BFR e BFA (BFR/BFA).

3.2.4. Análise Estatística

Os dados, exceto a taxa de sobrevivência na aclimatização, foram submetidos aos testes de normalidade dos resíduos de Shapiro-Wilk e de homocedasticidade de Bartlett a 5% de significância. Após estes, os dados de contagem do experimento de cultivo *in vitro* (NB, NF e NR) foram transformados para \sqrt{x} . Para as demais variáveis, incluindo o experimento de aclimatização, os dados não necessitaram de transformação. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$), considerando o DIC em arranjo fatorial (4x4) para o experimento de cultivo *in vitro*, para o qual foram ajustados modelos de regressão polinomial, e DIC com arranjo simples (um fator) para a fase de aclimatização. Além disso, foram calculados os coeficientes de correlação linear de Pearson para as variáveis estudadas, a 5% de significância.

Estas análises foram realizadas com auxílio dos pacotes *ExpDes.pt* (FERREIRA; NOGUEIRA; ALVES, 2013) e *agricolae* (MENDIBURU, 2015), a partir do software R versão 3.2.5 (R CORE TEAM, 2016); e os pontos críticos das curvas de regressão, pelo uso do programa Winplot versão 1.55 (PARRIS; JESUS, 2012).

3.3. Resultados

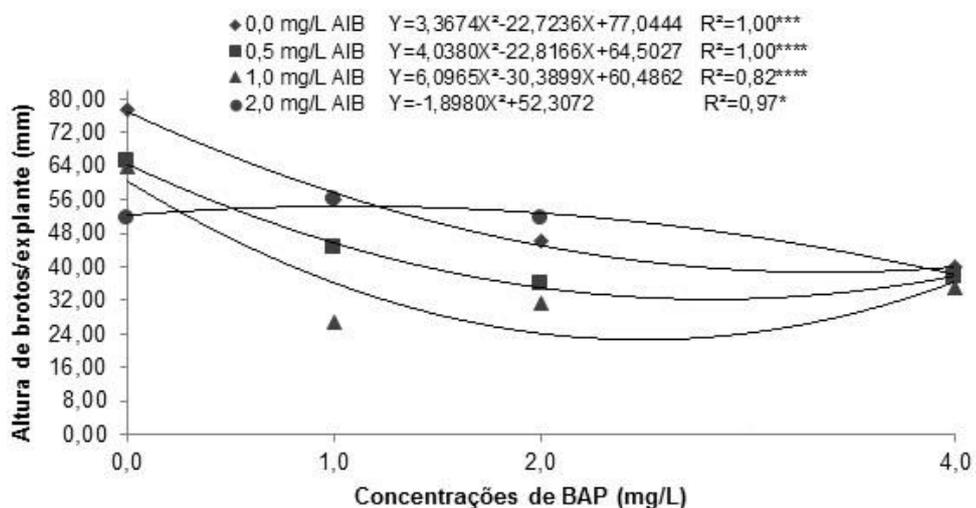
3.3.1. Efeito de diferentes concentrações de BAP e AIB na propagação *in vitro* de *E. elatior*

Após 60 dias em meio de cultivo MS, constatou-se efeito significativo da interação entre as doses de BAP e AIB para todas as variáveis analisadas (Tabela 1). Dessa forma, as combinações de auxina e citocinina testadas no presente estudo foram capazes produzir efeitos sinérgicos sobre o crescimento e desenvolvimento de explantes de *E. elatior*.

Para a altura de brotos, foram constatadas diferenças significativas na curva de regressão para as concentrações de BAP em todas as doses de AIB, onde se observou, de modo geral, decréscimo devido ao aumento das concentrações de ambos, em que a auxina foi a mais responsiva para esta variável (Figura 2). Assim, na ausência de BAP, maiores valores de altura foram obtidos com o decréscimo da concentração de AIB. O tratamento controle (0,0 mg/L de BAP e AIB) promoveu maior altura dos brotos após 60 dias de cultivo (77,62 mm), quando comparado a todos os tratamentos de combinação de BAP e AIB. Entretanto, com a adição de AIB, o tratamento que apresentou o maior valor médio foi 0,0 mg/L de BAP e 0,5 mg/L de AIB, cuja média foi igual a 64,96 mm, sendo este 0,16 vezes menor que o controle.

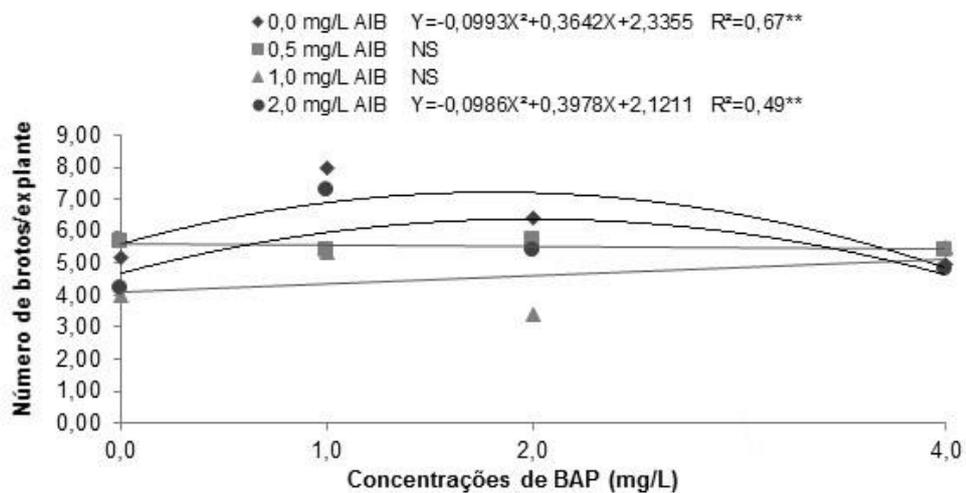
A análise de regressão mostrou curvas quadráticas com valores descendentes, exceto para as combinações de BAP com 2,0 mg/L de AIB, cuja análise de regressão permitiu a estimativa de ponto máximo com 1,07 mg/L de BAP, o que proporcionou altura estimada de 54,47 mm, sendo esta 30% menor do que a observada no tratamento controle (77,62 mm). Porém, para as curvas decrescentes, a análise dos pontos críticos permitiu estimar o menor valor de altura (22,61 mm) para 1,0 mg/L de AIB combinado com 2,49 mg/L de BAP, seguido da combinação de 0,5 mg/L de AIB com 2,83 mg/L de BAP (32,27 mm) e de 0,0 mg/L de AIB com 3,37 mg/L de BAP (38,71 mm), representando esta, metade da maior média observada para altura de brotos, no tratamento controle (Figura 2).

Figura 2 – Altura de brotos de explantes de *E. elatior* cultivados com diferentes concentrações de BAP e AIB, após 60 dias de cultivo *in vitro*. *: modelo de regressão significativo ($p \leq 0,05$), ***: modelo de regressão significativo ($p \leq 0,001$), ****: modelo de regressão significativo ($p \leq 0,0001$).



Ao contrário do observado para a altura, o tratamento controle não foi o que proporcionou maior número de brotos. O efeito sinérgico de auxina e citocinina sobre o número de brotos foi significativo apenas na ausência e adição de 2,0 mg/L de AIB e o BAP foi o fitohormônio que mais influenciou esta variável, cuja maior média observada (7,97 brotos/explante) foi obtida utilizando 1,0 mg/L na ausência de AIB. Além disso, conforme análise dos pontos críticos das curvas de regressão, a combinação de BAP e AIB mais favorável à indução de brotação foi observada com valores máximos estimados obtidos com a ausência de AIB (0,0 mg/L) e 1,83 mg/L de BAP (7,13 brotos/explante), seguida do tratamento com 2,0 mg/L de IBA e 2,02 mg/L de BAP (6,35 brotos/explante) (Figura 3).

Figura 3 – Número de brotos de explantes de *E. elatior* cultivados com diferentes concentrações de BAP e AIB, após 60 dias de cultivo *in vitro*. NS: modelo de regressão não significativo, **: modelo de regressão significativo ($p \leq 0,01$).

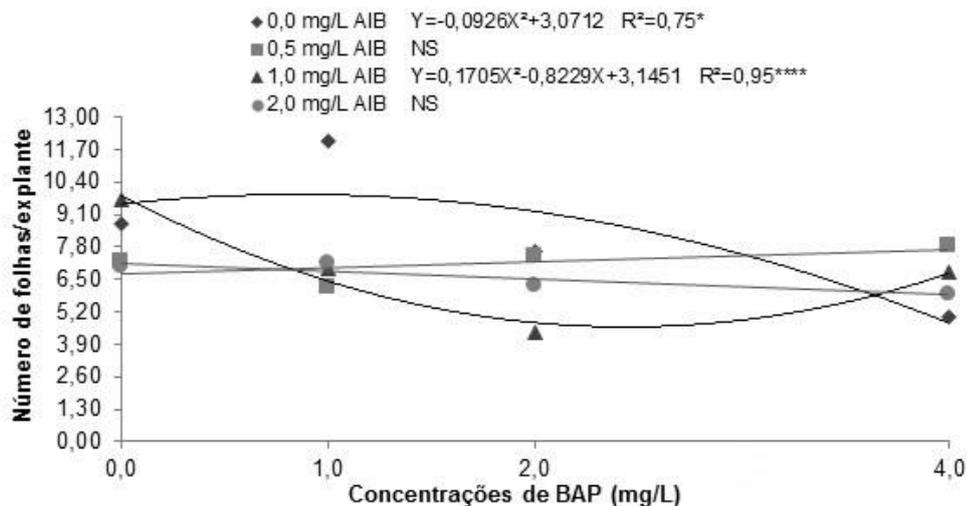


Constatou-se efeito significativo da aplicação de auxina e citocinina sobre o número de folhas apenas para as doses 0,0 mg/L e 1,0 mg/L de AIB. A presença de AIB reduziu o número de folhas, enquanto que o BAP foi responsável pelos maiores valores obtidos para esta variável, cuja maior média (12,05 folhas/explante) foi obtida com 1,0 mg/L de BAP e 0,0 mg/L de AIB (Figura 4).

Conforme análise dos pontos críticos das curvas de regressão, aumento significativo do número de folhas foi constatado com o aumento das doses de BAP, cujo valor máximo estimado (9,80 folhas/explante) foi obtido em 0,8 mg/L de BAP e 0,0 mg/L de AIB, o qual é apenas 0,18 vezes menor do que o observado para o tratamento com maior média (12,05 folhas/explante). Por outro lado, quando

adicionado 1,0 mg/L de AIB, obteve-se ponto mínimo de 4,62 folhas/explante para 2,41 mg/L de BAP.

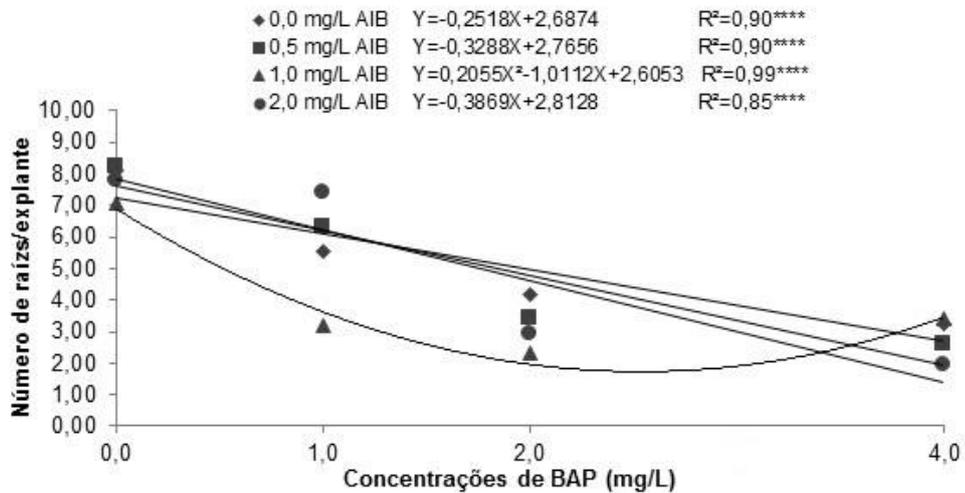
Figura 4 – Número de folhas de explantes de *E. elatior* cultivados com diferentes concentrações de BAP e AIB, após 60 dias de cultivo *in vitro*. NS: modelo de regressão não significativo, *: modelo de regressão significativo ($p \leq 0,05$), ****: modelo de regressão significativo ($p \leq 0,0001$).



Quanto ao número de raízes, constatou-se redução e diferença significativa para a curva de regressão em todos os tratamentos de combinação de BAP e AIB, onde a auxina foi a principal responsável pela indução de raízes, contudo o aumento de sua concentração não teve efeito positivo sobre esta variável. O tratamento com 0,5 mg/L de AIB e 0,0 mg/L de BAP foi responsável pela obtenção da maior média observada com 8,2 raízes/explante, apesar de sua curva de regressão ter apresentado comportamento descendente, confirmando que a presença de citocinina inibiu a indução do enraizamento dos brotos. Além disso, no tratamento controle foi observado resultado semelhante, com média de 8,11 raízes/explante (Figura 5).

De acordo com a análise de regressão, para 0,0 mg/L, 0,5 mg/L e 2,0 mg/L de AIB foram obtidas curvas lineares descendentes, à medida em que se aumentou as concentrações de BAP, cujos valores mínimos estimados foram, respectivamente, 2,82, 2,10 e 1,61 raízes/explante. Por outro lado, com a adição de 1,0 mg/L de AIB, foi observada regressão quadrática, cuja valor médio mínimo estimado foi de 1,85 raízes/explante com 2,46 mg/L de BAP (Figura 5).

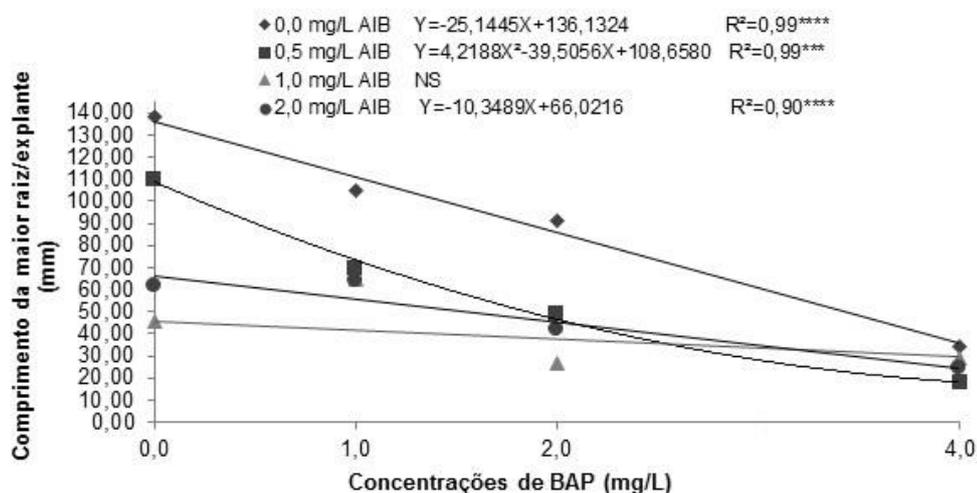
Figura 5 – Número de raízes de explantes de *E. elatior* cultivados com diferentes concentrações de BAP e AIB, após 60 dias de cultivo *in vitro*. ****: modelo de regressão significativo ($p \leq 0,0001$).



De modo semelhante ao constatado para a indução de raízes, o comprimento da maior raiz foi influenciado negativamente pela adição de BAP e AIB, e a auxina foi o fitohormônio que mais influenciou o alongamento radicular. Assim, o maior comprimento de raiz foi observado no tratamento sem adição de fitohormônio, com média observada de 138,01 mm/explante. Além disso, foi constatada diferença significativa nas curvas de regressão para todos os tratamentos, exceto para aqueles com 1,0 mg/L de AIB, a partir das quais observou-se redução do comprimento da maior raiz/explante com o aumento das doses de BAP e AIB (Figura 6).

Para as concentrações 0,0 mg/L e 2,0 mg/L de AIB foi obtida regressão linear negativa, com os valores de comprimento de raiz decrescendo com o aumento das concentrações de BAP, enquanto que para 0,5 mg/L de AIB houve regressão quadrática com ponto de mínima observado em 4,0 mg/L de BAP e média de 18,4 mm/explante (Figura 6).

Figura 6 - Comprimento da maior raiz de explantes de *E. elatior* cultivados com diferentes concentrações de BAP e AIB, após 60 dias de cultivo *in vitro*. NS: modelo de regressão não significativo, ***: diferença significativa ($p \leq 0,001$), ****: diferença significativa ($p \leq 0,0001$).



Conforme teste de correlação linear de Pearson, constatou-se correlação significativa positiva entre as variáveis estudadas, exceto entre a altura e o número de brotos e entre este e o número de raízes. Porém, as correlações significativas foram baixas, sendo maior do que 60% apenas entre as variáveis altura, número de raízes e comprimento da maior raiz (Tabela 2).

Tabela 2 – Coeficientes de correlação linear de Pearson entre as variáveis de crescimento e desenvolvimento de explantes de *E. elatior* após 60 dias de cultivo *in vitro*.

	Número de brotos	Número de folhas	Número de raízes	Comprimento da maior raiz
Altura	0,19 ^{ns}	0,44*	0,67*	0,63*
Número de brotos		0,36*	0,21 ^{ns}	0,32*
Número de Folhas			0,37*	0,45*
Número de raízes				0,62*

*: significativo a 5% probabilidade pelo teste t. ^{ns}: não significativo a 5% de probabilidade.

3.3.2. Efeito de diferentes tipos substratos na fase de aclimatização de *E. elatior*

A análise de variância indicou efeito significativo do tipo de substrato sobre a altura ($p=0,014$) e as biomassas fresca ($p=0,004$) e seca ($p=0,009$) da parte aérea de *E. elatior* na fase de aclimatização (Tabela 3).

No presente estudo, após 60 dias de cultivo, as plântulas aclimatizadas em substrato à base de areia:vermiculita (A:V) apresentaram maior taxa de

sobrevivência, comparadas ao substrato à base de areia:Plantmax® (A:P), com sobrevivência de 100% e 40% das plantas, respectivamente (Tabela 4).

Apesar da baixa taxa de sobrevivência em substrato contendo A:P, constatou-se maiores valores de altura e biomassa fresca e seca da parte aérea neste substrato, diferindo estatisticamente daquele com A:V. Por outro lado, não houve diferença significativa entre os substratos testados para o número de folhas, a relação entre os diâmetros menor e maior da base da haste, a biomassa fresca da raiz e sua relação com biomassa fresca da parte aérea (Tabela 4).

As variáveis que apresentaram correlação significativa, positiva, foram a altura (ALT) e as biomassas da parte aérea (BFA, BSA) e radicular (BFR). Os coeficientes acima de 70% foram observados nas correlações entre ALT e BSA, entre as biomassas frescas e entre BSA e BFR (Tabela 5).

Tabela 5 – Coeficientes de correlação linear de Pearson entre as variáveis altura (ALT), número de folhas (NF), relação entre diâmetro menor e maior da base da haste (DME/DMA), biomassa fresca (BFA) e seca (BSA) da parte aérea e fresca radicular (BFR) e relação entre BFR e BFA de plântulas de *E. elatior* após 60 dias de cultivo em fase de aclimatização.

	NF	DME/DMA	BFA	BSA	BFR	BFR/BFA
ALT	0,05 ^{ns}	-0,27 ^{ns}	0,52*	0,88*	0,56*	0,32 ^{ns}
NF		-0,22 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,35 ^{ns}	0,46 ^{ns}
DME/DMA			-0,03 ^{ns}	-0,33 ^{ns}	-0,21 ^{ns}	-0,38 ^{ns}
BFA				0,70*	0,87*	0,08 ^{ns}
BSA					0,75*	0,39 ^{ns}
BFR						0,56*

3.4. Discussão

3.4.1. Efeito de diferentes concentrações de BAP e AIB na propagação *in vitro* de *E. elatior*

No presente estudo, BAP isoladamente e em combinação com AIB não apresentou efeito positivo sobre o crescimento de brotos e produção e crescimento de raízes de *E. elatior*, tendo estas variáveis apresentado alta correlação significativa entre si (Tabela 2). Além disso, a auxina não influenciou significativamente o desenvolvimento destas variáveis.

De modo geral, apesar de auxinas serem comumente aplicadas para crescimento de brotos e indução de enraizamento e citocininas para indução de brotações e inibição da dominância apical (CID; TEIXEIRA, 2010), para plantas da

família Zingiberaceae como *Kaempferia galanga*, *Z. officinale* e *Z. petiolatum*, esta resposta na micropropagação poderá depender da auxina utilizada bem como de sua concentração, estando relacionada ou não com BAP. Neste sentido, maiores médias de altura, número de folhas e comprimento de raiz podem estar mais relacionadas à aplicação isolada de BAP ou sua ausência; e a maior indução de brotações e de raízes pode ser encontrada, respectivamente, quando BAP está associado a uma auxina e isolado no meio de cultivo (ABBAS et al., 2011; PARIDA et al., 2010; PRATHANTURARUG et al., 2004). No entanto, de acordo com Cid e Teixeira (2010) as citocininas podem causar inibição da indução de raízes em plântulas, o que foi observado no presente trabalho, com o aumento das doses de BAP.

Após a estimativa dos pontos críticos, constatou-se maior altura com a menor dose de BAP (1,07 mg/L) quando em combinação com a maior dose de AIB (2,00 mg/L). Isso significa que com adição de BAP só foi possível obter altura maior do que a observada com sua ausência quando combinadas estas doses de BAP e AIB. Além disso, semelhantemente aos resultados encontrados, Rescarolli e Zaffari (2009) verificaram que aos 45 dias de cultivo a adição de BAP ao meio de cultivo não promoveu efeito significativo sobre o crescimento de plantas de *E. elatior*, micropropagadas através de rizomas. Estudos anteriores reportaram retardo na altura de *Z. petiolatum* com a aplicação de várias concentrações de BAP isoladamente (0,5 – 8,0 mg/L) e em combinação com 0,1 mg/L de ácido 1-naftalenoacético – ANA (PRATHANTURARUG et al., 2004). Além disto, a adição isolada de AIB (1,0 – 3,0 mg/L) reduziu significativamente o comprimento de raiz de *E. elatior* em relação ao tratamento sem este fitohormônio (YUNUS et al., 2012).

No presente estudo, BAP exerceu influência sobre a produção de novos brotos e folhas, tendo maior eficiência sobre estas variáveis quando aplicado isoladamente ao meio MS, cujas maiores médias foram observadas com 1,0 mg/L de BAP. O efeito desta citocinina aplicada isoladamente ao meio MS sobre a formação de novos brotos de *E. elatior* foi comprovado por Santos et al. (2016), que estudaram a adição de 0 a 2,5 mg/L, em que observaram aos 60 dias de cultivo efeito linear crescente sobre a taxa de multiplicação de brotos. O BAP tem sido eficiente no aumento da indução de brotos e folhas de *E. elatior*, sendo o número de brotos superior ao tratamento controle para doses acima de 4,0 mg/L (ABDELMAGEED et al., 2011; YUNUS et al., 2012). Este fato foi observado em *Z.*

officinale para ambas as variáveis quando adicionado BAP a partir de 1,5 mg/L, destacando-se a dose 4,5 mg/L, a qual promoveu as maiores médias (ABBAS et al., 2011).

Na ausência de citocinina e auxina para multiplicação *in vitro* de *E. elatior*, os valores encontrados no presente estudo são muito superiores àqueles observados em estudos prévios para o mesmo tratamento. Enquanto nas condições experimentais foram encontradas médias de altura de brotos/explante de até 77,62 mm; número de brotos/explante igual a 5,20; 8,71 folhas/explante; 8,11 raízes/explante; e raízes com até 138,01 mm de comprimento no tratamento sem fitohormônio, Abdelmageed et al. (2011) constataram altura de 32,00 mm/explante, além de 1,3 brotos e 1,0 raiz/explante e raízes com até 30 mm de comprimento /explante. Salienta-se, ainda, que após 12 semanas de cultivo, Yunus et al. (2012) observaram que a ausência de fitohormônio resultava em valores máximos de altura de brotos de 12,30 mm/explante, 2,58 brotos e 1,47 folhas/explante e, após 8 semanas de cultivo para enraizamento, as raízes atingiram até 29,4 mm de comprimento/explante.

É notável, portanto, a influência da adição de citocinina sobre a maior indução de brotação e produção de folhas, pela diminuição da dominância apical e da senescência foliar (CID; TEIXEIRA, 2010), sugerindo-se a adição de 1,0 mg/L de BAP ao meio de cultivo, com ausência de AIB. Colombo et al. (2010) constataram que na fase de isolamento e estabelecimento de *E. elatior* em meio MS, aos 150 dias de cultivo, a ausência de citocinina não promoveu formação de novos brotos, tendo sido necessária a adição isolada de BAP ou em combinação com ácido indol-3-acético (AIA) ou ANA para a indução de brotações, em que a combinação de 4,95 mg/L de BAP e 2,63 mg/L de AIA promoveu maior número de brotos nesta fase. Por outro lado, na fase de multiplicação, aos 90 dias de cultivo, estes autores não observaram diferença estatística entre os tratamentos com e sem adição de BAP e/ou ANA.

3.4.2. Efeito de diferentes tipos substratos na fase de aclimatização de *E. elatior*

A fase de aclimatação permitiu verificar que a taxa de sobrevivência de plantas de *E. elatior* pode ser modulada pelo substrato utilizado. Para Yunus et al. (2012) o substrato ideal para obtenção da maior taxa de sobrevivência ($93,33 \pm 6.67$) na aclimatização desta espécie é composto por areia:solo:turfa de musgo (1:1:1),

quando comparado a areia, solo ou turfa de musgo isoladamente. Por outro lado, a resposta pode depender da espécie vegetal estudada, pois Abbas et al. (2011) observaram redução da taxa de sobrevivência de plantas de *Z. officinale* quando combinado areia e vermiculita com turfa de musgo (1:1:1) (60% de sobrevivência), comparado àquelas do substrato com apenas turfa de musgo (100%). Além disso, Oliveira et al. (2013) constataram 100% de sobrevivência de plantas de *Vanilla planifolia* aclimatizadas com substrato à base de Plantmax®.

No presente estudo, enquanto A:V possibilitou maior sobrevivência das plantas, A:P contribuiu para maior desenvolvimento das mesmas, porém reduziu para menos da metade a taxa de sobrevivência. Possivelmente, a composição química do substrato exerceu influência sobre o crescimento e a biomassa vegetal, por outro lado, não foi observada diferença significativa para a maioria das variáveis observadas, destacando-se a biomassa radicular e sua relação com a da parte aérea.

Constata-se, portanto, o potencial do substrato A:P para ser utilizado na aclimatização de *E. elatior* devido aos benefícios observados sobre o desenvolvimento das plantas durante esta fase, além de eliminar a necessidade de aplicação de solução nutritiva. Contudo, no presente estudo a concentração do Plantmax® no substrato foi de 33% (A:P, 2:1, v/v), o que possivelmente exerceu efeito tóxico sobre as plantas, portanto é recomendada a redução dessa concentração para obtenção de resultados satisfatórios. Pois, em estudo posterior, para as mesmas condições experimentais do presente trabalho, a utilização de substrato contendo apenas 17% de Plantmax®, à base de areia:vermiculita:Plantmax® (A:V:P, 2:2:1; v/v/v), possibilitou resultados satisfatórios, com maior taxa de sobrevivência das plantas de *E. elatior* (dados não publicados).

Por outro lado, conforme resultados do presente estudo, tendo em vista que a taxa de sobrevivência e o enraizamento das plantas é elemento fundamental para seleção de um substrato a curto período, como a aclimatização (CHANDRA et al., 2010; HAZARIKA, 2003), sugere-se a utilização do substrato A:V para plantas de *E. elatior* nesta fase. Este substrato possibilita ambiente adequado para o desenvolvimento do sistema radicular, como aeração, boa drenagem e retenção de umidade; o qual, suplementado com solução nutritiva, supre as necessidades nutricionais da planta.

3.5. Conclusões

No presente estudo foi demonstrado que durante a micropropagação a suplementação do meio de cultivo MS com 1,0 mg/L de BAP é suficiente para induzir a multiplicação de brotos e a produção de biomassa de *E. elatior* e que não há necessidade de adição de auxina para enraizamento dessas plantas. Nas condições do presente estudo, recomenda-se o uso de substrato à base de areia e vermiculita (1:1, v/v) para o sucesso durante a fase de aclimatização. Salienta-se que a utilização de Plantmax® na concentração de 33% não é viável, sugerindo-se diluição deste substrato visando possibilitar, além de mudas mais vigorosas, melhor desenvolvimento do sistema radicular.

Tabela 1 – Resultados da análise de variância para os fatores AIB, BAP e sua interação sobre o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de *E. elatior* após 60 dias de cultivo.

Fatores	Altura de brotos			Número de brotos*			Número de folhas*			Número de raízes*			Comprimento da maior raiz		
	Gl	F	p-valor	Gl	F	p-valor	Gl	F	p-valor	Gl	F	p-valor	Gl	F	p-valor
AIB	3	16,798	<0,001	3	5,118	0,003	3	3,699	0,016	3	4,130	0,01	3	111,30	<0,001
BAP	3	55,533	<0,001	3	5,89	0,001	3	6,917	<0,001	3	54,523	<0,001	3	165,46	<0,001
AIB x BAP	9	7,276	<0,001	9	2,214	0,032	9	5,878	<0,001	9	3,386	0,002	9	18,14	<0,001
Resíduo	64			64			64			64			64		
CV (%)	----- 15,13 -----			----- 12,54 -----			----- 11,54 -----			----- 15,09 -----			----- 15,73 -----		

* Dados transformados para $\sqrt{(x)}$.

Tabela 3 – Resultados da análise de variância para o fator substrato sobre o crescimento e desenvolvimento de plantas micropropagadas de *E. elatior* após 60 dias de cultivo em fase de aclimatização.

Fatores	Altura			Número de folhas			Diâmetro menor/menor da base da haste			Biomassa fresca da parte aérea			Biomassa seca da parte aérea			Biomassa fresca da raiz			Biomassa fresca da raiz/parte aérea		
	Gl	F	p-valor	Gl	F	p-valor	Gl	F	p-valor	Gl	F	p-valor	Gl	F	p-valor	Gl	F	p-valor	Gl	F	p-valor
Substrato	1	8,026	0,014	1	0,545	0,474	1	0,003	0,958	1	12,163	0,004	1	9,502	0,009	1	3,878	0,071	1	0,383	0,547
Resíduo	13			13			13			13			13			13			13		
CV (%)	----- 17,55 -----			----- 13,33 -----			----- 22,56 -----			----- 20,04 -----			----- 26,91 -----			----- 27,31 -----			----- 17,52 -----		

Tabela 4 – Efeito de substratos à base de Areia:Plantmax[®] (A:P) e Areia:Vermiculita (A:V) sobre o crescimento e desenvolvimento de plantas micropropagadas de *E. elatior* após 60 dias de cultivo em fase de aclimatização.

Substrato	Sobrevivência	Altura	Número de folhas	Diâmetro menor/menor da base da haste	Biomassa fresca da parte aérea	Biomassa seca da parte aérea	Biomassa fresca da raiz	Biomassa fresca da raiz/parte aérea
	(%)	--- (cm) ---		(mm/mm)	--- (g) ---	--- (g) ---	--- (g) ---	--- (g/g) ---
A:P	40	18,32±2,08 a	6,96±1,23 a	1,19±0,15 a	2,44±0,34 a	1,15±0,26 a	0,26±0,04 a	0,11±0,01 a
A:V	100	14,10±2,96 b	6,60±0,70 a	1,18±0,30 a	1,70±0,41 b	0,75±0,27 b	0,20±0,07 a	0,12±0,02 a

Médias (±D.P.) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F ao nível de significância de 5%.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo suporte financeiro; à Embrapa Semiárido (e equipe do Laboratório de Biotecnologia, especialmente Angela Katiussia Nascimento dos Santos Coelho e Elenício Gomes Coelho) e à Universidade Federal do Vale do São Francisco (e equipe do Laboratório de Microbiologia Geral/CCA) pelo suporte para execução dos experimentos.

Referências Bibliográficas

- ABBAS, M. S. et al. In vitro propagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosco). **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 165–172, 2011.
- ABDELMAGEED, A. H. A. et al. Micropropagation of *Etilingera elatior* (Zingiberaceae) by using axillary bud explants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 18, p. 4465–4469, 2011.
- ARYA, V.; KUMAR, D.; GAUTAM, M. Phytopharmacological review on flowers: Source of inspiration for drug discovery. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 4, n. 1, p. 45–51, 2014.
- CHAN, E.; LIM, Y. Y.; WONG, S. K. Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Etilingera elatior*: A Review. **Pharmacognosy Journal**, v. 3, n. 22, p. 6–10, 2011.
- CHANDRA, S. et al. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 9, p. 1199–1205, 2010.
- CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. . Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. 1ª. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p. 15–49.
- COLOMBO, L. A. et al. Estabelecimento de protocolo para multiplicação in vitro de Bastão-do-imperador (*Etilingera elatior*) Jack RM Sm. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 4, p. 695–700, 2010.
- FARIDAH, Q. Z. et al. Efficient in vitro regeneration of *Zingiber zerumbet* Smith (a valuable medicinal plant) plantlets from rhizome bud explants. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 46, p. 9303–9308, 2011.
- FERREIRA, E. B.; NOGUEIRA, P. P.; ALVES, C. D. **ExpDes.pt: Experimental Designs package**, 2013. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/package=ExpDes.pt>>. Acesso em: 16 maio. 2016.
- GÓMEZ-BETANCUR, I.; BENJUMEA, D. Traditional use of the genus *Renealmia* and *Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas (Zingiberaceae)-a review in the treatment of snakebites. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. S1, p. S574–S582, 2014.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. 1ª. ed.

Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 183–260.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, v. 85, n. 12, p. 1704–1712, 2003.

LIM, T. K. *Etilingera elatior*. In: LIM, T. K. (Ed.). **Edible Medicinal and Non Medicinal Plants**. 1. ed. [s.l.] Springer Netherlands, 2014. v. 8, p. 834–843.

LINS, S. R. O.; COELHO, R. S. B. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 332–335, 2004.
MENDIBURU, F. **agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research**. R package version 1.2-2, 2015. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>>. Acesso em 16 mai. 2016.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473–497, 1962.

OLIVEIRA, S. O. D. et al. A new procedure for in vitro propagation of vanilla (*Vanilla planifolia*) using a double-phase culture system. **Scientia Horticulturae**, v. 161, p. 204–209, 2013.

PARIDA, R. et al. Rapid multiplication and in vitro production of leaf biomass in *Kaempferia galanga* through tissue culture. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 4, 2010.

PARRIS, R.; JESUS, A. R. DE. **Winplot**. Phillips Exeter Academy, 2012. Disponível em: <<http://math.exeter.edu/rparris>>. Acesso em: 17 maio. 2016.

PRATHANTURARUG, S. et al. In vitro propagation of *Zingiber petiolatum* (Holttum). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 40, n. 3, p. 317–320, 2004.
R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2016. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>. Acesso em: 16 maio. 2016.

RESCAROLLI, C. L. S.; ZAFFARI, G. R. Produção de mudas de *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Sm. através da cultura de tecidos vegetais in vitro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 2, p. 190–195, 2009.

ROUT, G. R.; MOHAPATRA, A.; JAIN, S. M. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 6, p. 531–560, 2006.

SANTOS, E. O. et al. Multiplicação de bastão-do-imperador em resposta a concentrações de BAP e número de subcultivos. **Ornamental Horticulture**, v. 22, n. 1, p. 88-93, 2016.

SILVA, J. A. T. et al. *Anthurium in vitro*: A review. **Scientia Horticulturae**, v. 186, p. 266–298, 2015.

TERAO, D.; CARVALHO, A. C. P. P.; BARROSO, T. C. S. F. **Flores Tropicais**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005.

YUNUS, M. F. et al. In vitro propagation of *Etilingera elatior* (Jack) (torch ginger). **Scientia Horticulturae**, v. 135, p. 145–150, 2012.

ZHANG, A. et al. Large scale in vitro propagation of *Anoectochilus roxburghii* for commercial application: Pharmaceutically important and ornamental plant. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 158–162, 2015.

4. Aclimatização de Plantas Micropropagadas de *Etlingera elatior* (Jack) R. M. Inoculadas com Fungos Micorrízicos Arbusculares¹

Angélica Ricarte da Silva^a, Natoniél Franklin de Melo^b, Adriana Mayumi Yano-Melo^{c*}

^a Laboratório de Microbiologia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, 56300-990, Petrolina, PE, Brazil. E-mail: angelica.ricarte@hotmail.com

^b Laboratório de Biotecnologia, Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semiárido, Embrapa Semiárido, 56302-970, Petrolina, PE, Brazil. E-mail: natoniél.melo@embrapa.br

^c Laboratório de Microbiologia, Colegiado Acadêmico de Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, 56300-990, Petrolina, Pernambuco, Brazil.

RESUMO

O cultivo *in vitro* de plantas de *Etlingera elatior* é uma alternativa à propagação convencional, viabilizando a obtenção de plantas livres de patógenos e em larga escala. A inoculação das plantas com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) pode ser fundamental para garantir maior sobrevivência e desenvolvimento destas sob condições *ex vitro*. O estudo verificou o efeito da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares em plantas micropropagadas de *E. elatior* visando o seu estabelecimento na fase de aclimatização. Para isto, as plantas foram aclimatizadas em casa de vegetação durante 60 dias, as quais foram inoculadas ou não com *Claroideoglomus etunicatum* e/ou *Gigaspora albida*. O efeito dos FMA sobre a sobrevivência das plantas pôde ser constatado a partir de 30 dias após a inoculação; e aos 60 dias foi observado aumento de até 50% de sobrevivência, em relação às não micorrizadas. Além disso, a inoculação micorrízica também proporcionou maior performance no desenvolvimento das plantas, em relação àquelas não inoculadas, sendo possível observar efeito diferenciado das espécies de FMA estudadas (*C. etunicatum* e *G. albida*). Conclui-se que durante a aclimatização plantas de *E. elatior* apresentam respostas distintas às diferentes espécies de FMA utilizadas, cujo desenvolvimento foi maior na presença de *G. albida*, indicando a importância da seleção de isolados mais efetivos para o sucesso da técnica.

Palavras-chave: FMA, horticultura ornamental, cultivo *ex vitro*.

4.1. Introdução

Originária do sudeste asiático, *Etlingera elatior* (Jack) R. M. é uma planta tropical pertencente à família Zingiberaceae, a qual é composta por diversas espécies com aplicações na horticultura, destacando-se seu uso na culinária, medicina, ornamentação e paisagismo. Esta planta é convencionalmente propagada

¹ Trabalho a ser submetido à revista Scientia Horticulturae (Qualis A2 para Ciências Agrárias I)

* Corresponding author at: Laboratório de Microbiologia, Colegiado Acadêmico de Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, 56300-990, Petrolina, Pernambuco, Brazil.

Tel.: +5587999912112

E-mail addresses: angelica.ricarte@hotmail.com (A.R. Silva), natoniél.melo@embrapa.br (N.F. Melo), adriana.melo@univasf.edu.br (A.M. Yano-Melo).

por meio de rizomas, o que dificulta a sua produção em quantidade e qualidade comercial, devido à facilidade de proliferação de doenças por meio dessa técnica (Loges et al., 2008; Wong, 2008). O cultivo *in vitro* torna-se uma alternativa a este método, permitindo a propagação de plantas com controle fitossanitário e em larga escala (Faridah et al., 2011; Yunus et al., 2012).

Uma das etapas do cultivo *in vitro* é a fase de aclimatização, que consiste em uma transição em que a planta passa de uma condição heterotrófica (*in vitro*) para autotrófica (*ex vitro*), na qual os processos fisiológicos cruciais para a sua sobrevivência devem ser otimizados. Nessa fase, em virtude do rigoroso controle ambiental de plantas sob cultivo *in vitro* pode haver, como resultado, incapacidade das mesmas de superar as condições adversas proporcionadas pelo cultivo *ex vitro*, o que pode afetar sua eficiência fotossintética, reduzir defesa contra patógenos e prejudicar o desenvolvimento adequado do sistema radicular e de condução de seiva (Kapoor et al., 2008).

Dessa forma, os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) podem consistir em uma ferramenta fundamental a ser utilizada nesta fase, visto que estes proporcionam diversos benefícios às plantas com as quais se associam, como proteção contra estresses bióticos e abióticos, além de promoverem maior desenvolvimento vegetal (Smith e Read, 2008). Esses fungos são biotróficos obrigatórios e a simbiose envolve basicamente a troca de nutrientes, em que a planta fornece carbono (C) através dos produtos da fotossíntese e o fungo transfere nutrientes do solo, principalmente fósforo (P), para a planta (S. E. Smith e Smith, 2011).

Apesar de não haver especificidade, pode haver diferenças de resposta da planta à micorrização quando inoculada com diferentes fungos, mostrando variação na compatibilidade fungo-planta e na eficiência em promover o crescimento vegetal (Novais et al., 2014). Esta variação na compatibilidade foi constatada por Burleigh et al. (2002), que observaram que *Glomus mossae* aumentou o conteúdo de P e crescimento da planta associada, enquanto que *Gigaspora rosea* obteve este efeito contrário. Da mesma forma, outros estudos mostraram resposta distinta quanto ao crescimento e estabelecimento *ex vitro* de plantas inoculadas com diferentes espécies de FMA (Campanelli et al., 2014; Oliveira et al., 2011). Assim, a escolha do fungo a ser inoculado está relacionada à resposta do crescimento vegetal à micorrização (Smith et al., 2009), e a combinação de fungo-hospedeiro-substrato

compatíveis é critério essencial nessa seleção para máxima obtenção de benefícios oriundos da inoculação micorrízica (Azcón-Aguilar e Barea, 1997).

Há décadas já se conhecem os benefícios proporcionados pelos FMA na horticultura, os quais exercem influência sobre várias espécies de plantas de importância ornamental. Estudos realizados sob condições controladas têm mostrado o favorecimento desses fungos às plantas em vários aspectos do seu crescimento e desenvolvimento (Koltai, 2010). Neste sentido, a inoculação com FMA visando o estabelecimento *ex vitro* de plantas na horticultura tem sido amplamente recomendada, pois garantem maior tolerância de plantas micropropagadas às condições adversas enfrentadas durante esta fase (Azcón-Aguilar e Barea, 1997; Kapoor et al., 2008).

Estudo anterior demonstrou ocorrência generalizada de FMA em plantas da família Zingiberaceae (Uma et al., 2010), podendo o efeito desses fungos sobre o cultivo *ex vitro* dessas plantas ser modulado pelas condições do estudo. Silva et al., (2006), por exemplo, verificaram que o uso de substratos com alta fertilidade (i. e. vermicomposto) reduz a ação dos FMA no crescimento de *Alpinia purpurata* e *Zingiber spectabile*. Por outro lado, a utilização de substrato constituído de pó de coco proporcionou benefícios à micorrização das plantas *Z. spectabile* inoculadas (Oliveira et al., 2010). A utilização destes fungos também pode ser uma alternativa à aplicação de P durante a fase de aclimatização, como observado para o crescimento de *Z. officinale* cultivado em substrato à base de solo e areia (Santos et al., 2010; Silva et al., 2008).

Portanto, os FMA são uma ferramenta biotecnológica viável, principalmente para culturas que passam por fase de mudas, como aquelas da horticultura em que as plantas são cultivadas em viveiros, vasos ou *in vitro* (Azcón-Aguilar e Barea, 1997). Além disso, é possível associar duas ferramentas biotecnológicas para obtenção de plantas com alto valor agregado e garantindo uma produção mais sustentável na horticultura: a micropropagação e a simbiose micorrízica (Campanelli et al., 2014).

A hipótese a ser testada neste trabalho é de que a seleção de espécies de FMA é primordial para que plantas de *E. elatior* possam ser beneficiadas pela inoculação micorrízica no seu desenvolvimento. Dessa forma, objetivou-se verificar o efeito da inoculação de duas espécies de FMA (*Claroideoglomus etunicatum* e *Gigaspora albida*) sobre o estabelecimento *ex vitro* de plantas micropropagadas de

E. elatior afim de sugerir a utilização desses fungos na fase de aclimatização dessa planta.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Micropropagação

Plantas de *E. elatior*, previamente estabelecidas *in vitro* no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido (Petrolina, PE, Brasil) foram subcultivadas em meio semissólido MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 3% (p/v) de sacarose e 2,0 mg/L de BAP (6-benzilaminopurina), com 0,45% de ágar e pH ajustado para 5,8. O meio de cultura foi previamente autoclavado a 121 °C e 1 atm durante 20 minutos. Os subcultivos foram realizados a partir da inoculação de explantes com cerca de 1 cm, retirados da porção basal entre o sistema radicular e o caule contendo meristemas caulinares dos brotos; e as culturas foram mantidas em sala de crescimento a 25±2 °C, com fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) e intensidade luminosa em torno de 35 µmol m⁻² s⁻¹.

4.2.2. Aclimatização e Delineamento experimental

Plântulas micropropagadas, com raízes e folhas desenvolvidas, foram previamente selecionadas com base na altura e aclimatizadas durante 60 dias em casa de vegetação (Fig. 1), com média de temperatura de 30,5±3 °C e de umidade relativa do ar de 57±9%. As raízes foram lavadas para retirar o excesso de meio de cultura e transplantadas para vasos de polietileno (11,5 cm de altura x 13,5 cm de diâmetro maior x 9 cm de diâmetro menor), contendo substrato a base de areia:vermiculita (1:1 v/v), o qual foi previamente esterilizado a 121 °C e 1 atm durante uma hora.

No momento do transplante, foi realizada a inoculação com espécies de FMA (*Claroideoglossum etunicatum* e/ou *Gigaspora albida*), via solo-inóculo (contendo glomerosporos, fragmentos de raízes colonizadas e hifas de FMA), depositado diretamente sobre as raízes, padronizando-se 1.500 propágulos infectivos/cm³ em cada vaso. Visando equilibrar a microbiota do substrato, todas as plantas foram suplementadas com 2 mL de um filtrado (isento de FMA) preparado a partir do peneiramento da diluição dos dois inóculos (1.500 propágulos infectivos/cm³ de cada inóculo em 100 mL de água destilada) em peneira de 45 µm. A irrigação foi feita com

água destilada, e, uma vez por semana, foi substituída por 40 mL de solução nutritiva preparada com sais MS com 50% de sua concentração padrão.

O experimento foi conduzido em DIC, contendo 4 tratamentos de inoculação (NI – não inoculado; Ga – inoculado com *G. albida*; Ce – inoculado com *C. etunicatum*; e MIX – inoculado com a mistura de Ga e Ce), com 10 repetições (uma planta por repetição).

4.2.3. Inóculo micorrízico

Os inóculos de FMA, *C. etunicatum* [URM FMA 03] e *G. albida* [URM FMA 11], foram providos do banco de inóculos da Universidade Federal de Pernambuco (Recife/PE). Foram multiplicados em casa de vegetação no período de setembro a dezembro de 2014, utilizando-se o substrato à base de solo esterilizado: areia (1:1, v/v) e o milho (*Zea mays* L.) como planta multiplicadora. Os inóculos *C. etunicatum* e *G. albida* apresentavam, respectivamente, 50,3 glomerosporos g⁻¹ de solo e 140 propágulos cm⁻³ de substrato e 8,8 glomerosporos g⁻¹ de solo e 170 propágulos cm⁻³ de substrato. Os glomerosporos foram extraídos do substrato pela técnica de peneiramento úmido (Gerdemann e Nicolson, 1963) e centrifugação em água e sacarose (Jenkins, 1964; modificado com 50% de sacarose), e posteriormente quantificados em placa canaletada com o auxílio do estereomicroscópio. A quantificação do número mais provável (NMP) de propágulos infectivos de FMA (propágulos cm⁻³ de substrato) foi feita pela técnica de Feldmann e Idczak (1994), a partir de diluições do inóculo em tubetes com capacidade aproximada de 250 mL de substrato, as quais foram realizadas na ordem de 0, 1/10, 1/100 e 1/1000, em cinco repetições, com areia lavada esterilizada, utilizando-se o milho como planta hospedeira, cujas raízes foram clarificadas e coradas pela técnica de Phillips e Hayman (1970), após 30 dias, para análise da presença de colonização micorrízica, cujos dados foram confrontados com a tabela de Cochran (1950).

4.2.4. Medidas de crescimento da planta

Durante os 60 dias de aclimatização, para cada tratamento, as plantas foram avaliadas, quinzenalmente, quanto ao percentual de sobrevivência. Ao final do experimento, foram avaliados: incremento de altura, número de folhas, área foliar, biomassa fresca e seca da parte aérea, biomassa fresca da raiz, estimativa do comprimento total da raiz. Para o percentual de sobrevivência foram consideradas

10 repetições, enquanto que para as demais variáveis foram consideradas apenas cinco repetições.

O incremento de altura foi determinado a partir da diferença entre a altura final (aos 60 dias) e inicial (transplântio). A área foliar foi medida com auxílio do equipamento CI-202 LASER AREA METER (CID Bio-Science). Enquanto que para a determinação da biomassa seca, a parte aérea foi mantida em estufa de circulação de ar forçada a 60 °C até atingir peso constante.

Para o comprimento total da raiz de cada repetição foram utilizadas as mesmas amostras processadas e avaliadas para a determinação do percentual de colonização micorrízica (Giovannetti e Mosse, 1980; Phillips e Hayman, 1970). Após avaliação, o comprimento total da raiz foi estimado conforme equação 1 (Newman, 1966):

$$R = \frac{\pi NA}{2H} \quad (1)$$

Em que R é o comprimento total da raiz (cm), considerando uma amostra de cerca de 0,5 g de raiz; N é o número de interseções entre a raiz e as linhas de grade; A é a área do quadrante (cm²); e H é o perímetro do quadrante (cm).

4.2.5. Medidas da micorriza

Foram avaliados o número de glomerosporos e percentual de colonização micorrízica, além da resposta de crescimento da planta à micorrização. A extração dos glomerosporos foi realizada a partir de 100 g de substrato fresco pela técnica do peneiramento úmido (Gerdemann e Nicolson, 1963) e centrifugação em água e sacarose (Jenkins, 1964; modificado com 50% de sacarose), procedendo-se com a quantificação em placa canaletada, com auxílio de estereomicroscópio.

Para a avaliação da colonização radicular por FMA, as raízes foram lavadas em água corrente, secas a temperatura ambiente (cerca de 28 °C) por aproximadamente uma hora, a partir das quais retirou-se uma amostra de 0,5 g. O processamento foi seguido por diafanização em KOH (10%) durante 24 horas e clarificação em H₂O₂ (10%) + KOH (10%) (1:1 v/v) durante 15 minutos, depois as raízes foram acidificadas com HCl (1%) por cinco minutos e coradas com azul de trypan (0,05%) em lactoglicerol por período *overnight* (Phillips e Hayman, 1970). Após o processamento as raízes foram levadas ao estereomicroscópio para quantificação do percentual de colonização micorrízica pela técnica da intersecção

de quadrantes, com observação de todos os intersectos (Giovannetti e Mosse, 1980).

A partir da biomassa fresca total (raiz e parte aérea), foi calculada a resposta de crescimento da planta à micorrização (RCM), conforme equação 2 (Hetrick et al., 1992):

$$RCM = \frac{100x(I - NI)}{NI} \quad (2)$$

Em que, I e NI representam a biomassa da planta com e sem FMA, respectivamente.

4.2.6. Análise estatística

Os dados, exceto para as variáveis RCM e percentual de sobrevivência, foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e de homogeneidade das variâncias de Bartlett a 5% de significância. Em seguida, quando os dados se apresentaram normais e com variâncias homogêneas, foram submetidos à ANOVA ($p < 0.05$) e ao teste de comparação múltipla de médias de Tukey ($p < 0.05$), com auxílio do pacote *ExpDes.pt* (Ferreira et al., 2013). Quando, mesmo após transformação dos dados, não houve normalidade nem homogeneidade das variâncias, foi realizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade, utilizando o pacote *dunn.test* (Dinno, 2016). Foram, também, calculados os coeficientes de correlação linear de Pearson entre as variáveis analisadas ao final do experimento, a partir do pacote *agricolae* (Mendiburu, 2015). As análises foram realizadas com auxílio do software R versão 3.2.1 (R CORE TEAM, 2015).

4.3. Resultados

As plantas de *Etlingera elatior* foram beneficiadas pela inoculação micorrízica, as quais apresentaram desenvolvimento adequado, estando prontas para serem transplantadas para condições de campo.

Quando inoculadas com FMA, comparadas às plantas não inoculadas, apresentaram maior percentual de sobrevivência (Figura 1). Plantas micorrizadas tiveram redução na sobrevivência entre o 30° e 45° dia de aclimatização, estabilizando os valores a partir deste período; ao contrário, plantas não

micorrizadas (NI) sofreram redução na sobrevivência ao longo dos 60 dias de duração do experimento. Neste período, houve sobrevivência de apenas 40% das plantas não inoculadas, enquanto que aquelas com *G. albida* (Ga) apresentaram maior percentual (90%), seguidas daquelas inoculadas com *C. etunicatum* (Ce; 80%) e ambos os fungos (MIX; 80%) (Figura 1). Ou seja, plantas micorrizadas aumentaram em, pelo menos, 50% a sobrevivência das plantas em relação às não inoculadas.

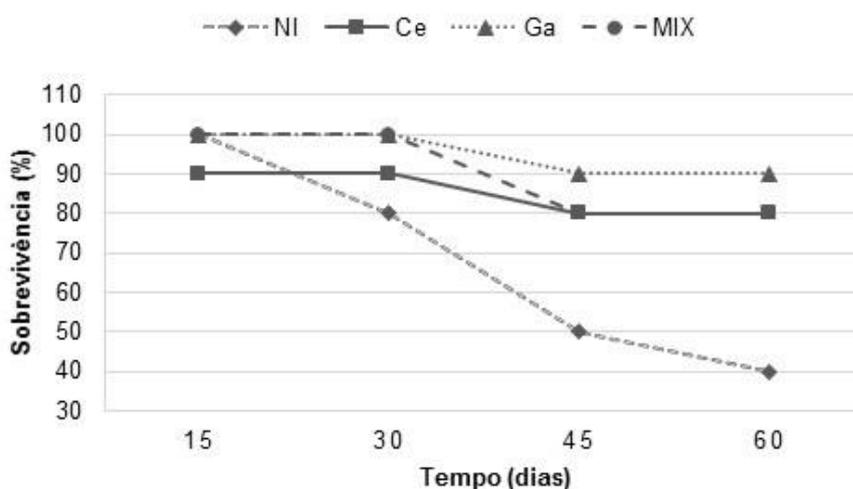


Figura 1. Percentual de sobrevivência de plantas de *Etilingera elatior* após 15, 30, 45 e 60 dias de aclimatização sem micorriza (NI) ou inoculadas com *Claroideoglossum etunicatum* (Ce), *Gigaspora albida* (Ga) ou ambos (MIX).

Após 60 dias de aclimatização, constatou-se correlação linear significativa positiva entre as variáveis relacionadas ao crescimento vegetativo de *E. elatior* (incremento de altura, número de folhas, área foliar, biomassa fresca aérea e radicular e seca aérea e comprimento total de raiz), contudo não houve correlação significativa entre o incremento de altura e o número de folhas. Da mesma forma, o comprimento total de raiz não se correlacionou com o número de folhas e a biomassa fresca da raiz. Além disso, as variáveis que dizem respeito à associação micorrízica (percentual de colonização e número de glomerosporos) estiveram positivamente correlacionadas, porém apenas entre si (Tabela 1).

De modo geral, as plantas inoculadas com *G. albida* (Ga) apresentaram maior desenvolvimento, comparadas aos demais tratamentos (Tabela 2). Enquanto plantas micorrizadas por Ga apresentaram maior média de área foliar ($102,13 \pm 9,20$ cm²) e biomassa fresca aérea ($4,57 \pm 0,79$ g), não houve diferença na altura e biomassa

fresca radicular e seca aérea entre Ga e o tratamento sem inoculação (NI). Entretanto, para o número de folhas e comprimento total de raiz não foi constatado efeito significativo da inoculação com FMA.

Por outro lado, em geral, a inoculação com Ce e o MIX de ambas as espécies de FMA não promoveu desenvolvimento de *E. elator* na aclimatização (Tabela 2). Neste sentido, constatou-se resposta positiva de crescimento da planta à micorrização (RCM) apenas no tratamento com *G. albida* (265,64%), oposto ao que foi observado para *C. etunicatum* (-60,59%) e o MIX (-58,6%).

Todas as plantas que receberam inoculação micorrízica foram colonizadas e àquelas do tratamento NI não formaram associação com FMA, mostrando que a inoculação foi efetiva e que não houve contaminação. Houve maior colonização micorrízica nas plantas submetidas aos tratamentos Ga e MIX, enquanto que o número de glomerosporos diferiu apenas entre estes tratamentos. Constatou-se que enquanto Ga e MIX colonizaram $38,39 \pm 8,38\%$ e $43,50 \pm 11,74\%$ da raiz, respectivamente, a colonização radicular por Ce foi de apenas $6,51 \pm 0,18\%$ (Tabela 2).

Tabela 1

Correlação de Pearson entre incremento de altura (IH), número de folhas (NF), área foliar (AF), biomassa fresca (BFA) e seca (BSA) da parte aérea, biomassa fresca da raiz (BFR), comprimento total da raiz (CTR), colonização micorrízica (CM) e número de glomerosporos (NG) após 60 dias de aclimatização de plantas de *Etlingera elatior* inoculadas ou não com *Claroideoglossum etunicatum* (Ce), *Gigaspora albida* (Ga) ou ambos (MIX).

	NF	AF	BFA	BSA	BFR	CTR	CM	NG
IH	0,25 ^{ns}	0,71*	0,80*	0,67*	0,79*	0,73*	0,39 ^{ns}	0,11 ^{ns}
NF		0,56*	0,49*	0,50*	0,65*	0,09 ^{ns}	-0,07 ^{ns}	-0,23 ^{ns}
AF			0,91*	0,68*	0,81*	0,52*	0,07 ^{ns}	0,00 ^{ns}
BFA				0,68*	0,84*	0,56*	0,30 ^{ns}	0,22 ^{ns}
BSA					0,63*	0,57*	0,20 ^{ns}	-0,15 ^{ns}
BFR						0,40 ^{ns}	0,15 ^{ns}	-0,06 ^{ns}
CTR							0,25 ^{ns}	0,12 ^{ns}
CM								0,48*

*: significativo a 5% de probabilidade pelo teste T. ^{ns}: não significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 2

Efeito da inoculação ou não (NI) com *Claroideoglobus etunicatum* (Ce), *Gigaspora albida* (Ga) ou ambos (MIX) sobre o crescimento de *Etlingera elatior* e a simbiose micorrízica após 60 dias de aclimatização.

Tratamento	Incremento de altura	Número de folhas	Área foliar	Biomassa fresca		Biomassa seca	Comprimento total de raiz	Colonização micorrízica	Número de glomerosporos
	--- (cm) ---	-----	-- (cm ²) --	--Aérea (g)--	--Raiz (g)--	--Aérea (g)--	---- (mm) ----	--- (%) ---	(100 g ⁻¹ substrato)
NI	13,73±4,53 ab	5,27±0,27 a	80,44±10,90 b	2,99±0,51 b	1,28±0,20 a	0,33±0,09 a	353,16±39,30 a	0,00±0,00	0,00±0,00
Ce	6,40±1,23 c	4,00±0,29 a	38,45±12,16 c	1,09±0,27 c	0,59±0,24 b	0,17±0,06 b	291,71±50,75 a	6,51±0,18 b	20,31±1,14 ab
Ga	19,02±0,95 a	5,20±0,19 a	102,13±9,20 a	4,57±0,79 a	1,58±0,24 a	0,36±0,09 a	394,79±67,24 a	38,39±8,38 a	25,95±4,03 a
MIX	12,84±4,02 b	3,80±0,21 a	41,36±9,91 c	1,75±0,56 c	0,79±0,21 b	0,25±0,09 ab	351,99±60,62 a	43,50±11,74 a	15,72±6,72b
p-valor	<0,001	0,08	<0,001	<0,001	<0,001	0,008	0,066	<0,001	0,014
CV (%)	24,06	23,03	16,16	21,72	21,13	29,12	15,95	30,4	22,13

Médias (±D.P.) seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre os tratamentos de inoculação micorrízica de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.4. Discussão

O percentual de sobrevivência observada das plantas inoculadas com *G. albida* (90%) e *C. etunicatum* (80%) foi superior ao observado para aquelas não inoculadas (40%). Esta resposta, porém, pode variar de acordo com a espécie vegetal, pois enquanto *Alpinia purpurata* apresentou apenas 50% de sobrevivência quando inoculada com *G. albida*, 25% com *C. etunicatum* e 87,5% na ausência de FMA, para *Zingiber spectabile* essa taxa foi de 100% nos tratamentos com *G. albida* e na ausência de FMA e de 85% com *C. etunicatum*, ambas aclimatizadas em solo, o qual apresentava fertilidade elevada, com até 209 mg dm⁻³ de P e 92,5 g Kg⁻¹ de matéria orgânica (Silva et al., 2006). Da mesma forma, não houve efeito da inoculação micorrízica sobre a taxa de sobrevivência de *T. ananassae*, em que *G. albida* teve menor percentual (80%), comparado ao tratamento controle sem FMA e com *C. etunicatum* (ambos com 100%), conforme observado por Oliveira et al. (2011).

A maior sobrevivência de *E. elatior* quando inoculada com FMA, especialmente com *G. albida* (Ga), pode ter sido resultado dos benefícios promovidos pela simbiose. Em helicônia, apesar da alta taxa de colonização por *Gigaspora margarita* (55,95%), não foi observado efeito significativo da inoculação micorrízica, incluindo outros FMA, como *Glomus clarum* (= *Rhizoglomus clarus*) e *Glomus etunicatum* (= *Claroideoglomus etunicatum*), sobre o crescimento dessa planta em fase de aclimatização (Sato et al., 1999). Por outro lado, em *Z. officinale* foram observados maiores valores de medidas de crescimento quando inoculada com FMA, comparada ao tratamento sem micorriza (Santos et al., 2010).

Os resultados mostraram de forma clara a influência da inoculação com FMA sobre o sucesso da aclimatização de *E. elatior*, com destaque para o inóculo de *G. albida*, cujo efeito pode ser garantido já aos 45 dias após a inoculação. Oliveira et al. (2011) também constataram benefícios da inoculação micorrízica sobre plantas aclimatizadas de *Tapeinochilos ananassae* com maior evidência a partir dos 45 dias após a inoculação. De modo geral, para espécies de FMA das famílias Glomeraceae e Gigasporaceae, esse tempo é suficiente para que ocorra colonização efetiva na raiz da planta hospedeira (Hart and Reader, 2002). Entretanto, constatou-se que o percentual de colonização no sistema radicular das plantas inoculadas por Ga (38,39%) foi quase seis vezes maior do que o encontrado em Ce (6,51%), porém não diferiu estatisticamente do MIX (43,50±11,74). Sugere-se, portanto, que os valores similares de colonização micorrízica (CM) de Ga e o MIX pode indicar maior atividade associativa de Ga. Assim, os FMA podem apresentar

diferença funcional quanto à promoção do crescimento vegetal e à taxa de colonização radicular mostrando haver compatibilidade diferenciada entre o fungo e a planta através da resposta da planta à inoculação (Novais et al., 2014).

No presente estudo, as plantas inoculadas com Ga apresentaram melhoria quanto à altura, área foliar e biomassa fresca da parte aérea, observando-se RCM positiva com esta espécie de FMA. Por outro lado, não foi observado efeito positivo da inoculação com Ce, indicando possivelmente pouca compatibilidade, e nem sinergismo das duas espécies de FMA sobre essas variáveis. Ao contrário, parece ter ocorrido competição entre os isolados, ou apenas efeito de Ga, pois no tratamento com o MIX também se constatou RCM negativa, evidenciando variabilidade funcional também do ponto de vista das espécies de FMA estudadas, as quais apresentaram efeitos diferentes quanto à altura e à biomassa da parte aérea e da raiz, destacando Ga em relação a Ce. Assim, apesar de em alguns casos plantas inoculadas com várias espécies de FMA simultaneamente apresentarem maior desenvolvimento durante a aclimatização, em relação àquelas inoculadas com espécies isoladas, como observado por Moreira et al. (2015) em substrato com baixo nível de P ($\leq 40 \text{ mg Kg}^{-1}$), nosso estudo não recomenda a inoculação simultânea de Ce e Ga para aclimatização de plantas de *E. elatior*, tendo em vista a baixa resposta destas plantas quando inoculadas com o MIX.

Neste sentido, Ga demonstrou ser mais cooperativo do que os demais tratamentos, considerando que a simbiose pode ser modulada pelos simbiossiontes participantes. O conceito de FMA mais e menos cooperativos está relacionado ao fato de que em algumas combinações fungo x planta ocorre maior suprimento de C para a espécie de fungo que proporciona maiores benefícios ao hospedeiro, enquanto este fungo aumenta sua oferta de P para a planta à medida que esta lhe fornece mais C (Kiers et al., 2011), mas isso não significa que o fungo menos cooperativo não é compatível com o mesmo hospedeiro, o que pode ser evidenciado por alta taxa de colonização deste fungo (Sato et al., 1999). Além disso, é possível constatar que a estabilidade do mutualismo se dá por ambas as partes, não estando apenas um dos simbiossiontes no controle da simbiose.

Assim, a resposta de crescimento de plantas micorrizadas pode ser altamente positiva, neutra ou negativa, o que pode ser influenciado por fatores tanto da planta quanto do fungo, juntos ou separadamente (F. A. Smith and Smith, 2011; S. E. Smith and Smith, 2011). Além disso, respostas do crescimento de plantas micorrizadas podem estar relacionadas ao fungo inoculado e, tanto ao custo de C para a planta manter a simbiose, como ao balanço diferenciado na absorção de nutrientes via direta (raízes) e indireta (micélio externo), como revisado por Smith et al. (2009) e S. E. Smith and Smith (2011),

podendo a colonização radicular pela espécie de fungo menos cooperativa resultar em alto custo de C para a planta (Kiers et al., 2011).

Outro aspecto que deve ser levado em consideração é que membros da família Gigasporaceae possuem maior capacidade de produzir biomassa micelial a partir de uma única hifa, sem a necessidade de interceptação de novas hifas, e de produzir essa biomassa em maior quantidade no ambiente do substrato (extrarradicular), facilitando a absorção de nutrientes pela via micorrízica. No entanto, espécies da família Glomeraceae produzem seu micélio por meio da interceptação com outras hifas (Voets et al., 2006), e geram sua maior biomassa dentro da raiz (Hart and Reader, 2002). Porém é necessária a quantificação da biomassa fúngica total, incluindo a extrarradicular, para melhor entendimento do custo de C fornecido pela planta, pois, apesar de no presente estudo *Ceter* ter colonizado apenas 6,51% da raiz, a planta apresentou baixa responsividade à micorrização, mostrando que nem sempre uma baixa colonização radicular implica em maior demanda de C para o fungo.

Outros estudos também mostraram a eficiência do uso de FMA na aclimatização, com obtenção de maiores taxas de sobrevivência e crescimento, garantindo o estabelecimento *ex vitro* de outras plantas da horticultura, como em *Gerbera* sp. (Sato et al., 1999), *Curcuma zedoaria* (Miachir et al., 2004), *Gloriosa superba* (Yadav et al., 2013), *Cynara cardunculus* (Campanelli et al., 2014), *Musa* spp. (Kavoo-Mwangi et al., 2013; Koffi and Declerck, 2015; Yano-Melo et al., 1999) e três cultivares de *Paeonia* (Wen et al., 2016), entre outras. Isto confirma a importância do uso dos FMA como ferramenta biotecnológica para produção sustentável de mudas com qualidade e potencial de produção em larga escala, visando a obtenção de material vegetal que possa ser recomendado para sua implantação no campo.

4.5. Conclusões

O presente estudo fornece respostas para o entendimento da diversidade funcional de FMA, constatando-se que plantas de *E. elatior* micropropagadas podem responder de forma distinta à inoculação com *C. etunicatum* e *G. albida*. Recomenda-se, portanto, que essa planta seja inoculada com *G. albida* para seu estabelecimento *ex vitro*, dado o potencial desse fungo em favorecer o estabelecimento e crescimento vegetal na fase de aclimatização.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de mestrado concedida a A.R. Silva e o apoio financeiro (APQ) concedido a A.M. Yano-Melo, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa PQ concedida a A.M. Yano-Melo e N.F. Melo, à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Semiárido) pelo apoio logístico e de infraestrutura para execução do trabalho, e ao apoio dos parceiros de equipe dos laboratórios de Biotecnologia (Embrapa Semiárido), especialmente Elenício Gomes Coelho e Ângela Katiussia Nascimento dos S. Coelho, e Microbiologia Geral (Universidade Federal do Vale do São Francisco – Univasf, CCA).

Referências

- Azcón-Aguilar, C., Barea, J.M., 1997. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: Significance and potentials. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 68, 1–24. doi:10.1016/S0304-4238(96)00954-5
- Burleigh, S.H., Cavagnaro, T., Jakobsen, I., 2002. Functional diversity of arbuscular mycorrhizas extends to the expression of plant genes involved in P nutrition. *J. Exp. Bot.* 53, 1593–1601. doi:10.1093/jxb/erf013
- Campanelli, A., Ruta, C., Tagarelli, A., Morone-Fortunato, I., Mastro, G. de, 2014. Effectiveness of mycorrhizal fungi on globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) micropropagation. *J. Plant Interact.* 9, 100–106. doi:10.1080/17429145.2013.770928
- Cochran, W.G., 1950. Estimation of Bacterial Densities by Means of the “Most Probable Number”. *Biometrics* 6, 105–116.
- Dinno, A., 2016. dunn.test: Dunn’s Test of Multiple Comparisons Using Rank Sums. R package version 1.3.2. Available at: <https://cran.r-project.org/web/packages/dunn.test/index.html> (accessed 17.02.2016).
- Faridah, Q.Z., Abdelmageed, A.H.A., Julia, A.A., Nor Hafizah, R., 2011. Efficient in vitro regeneration of *Zingiber zerumbet* Smith (a valuable medicinal plant) plantlets from rhizome bud explants. *African J. Biotechnol.* 10, 9303–9308. doi:10.5897/AJB11.1182
- Feldmann, F., Idczak, E., 1994. Inoculum production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for use in tropical nurseries, in: Norris, J.R., Read, D.J., Varma, A.K. (Eds.), *Techniques for Mycorrhizal Research Methods in Microbiology*. Academic Press, London, pp. 799–833.
- Ferreira, E.B., Cavalcanti, P.P., Nogueira, D.A., 2013. ExpDes.pt: Experimental Designs package (Portuguese). R package version 1.1.2. Available at: <http://cran.r-project.org/package=ExpDes.pt> (accessed 17.02.2016).
- Gerdemann, J.W., Nicolson, T.H., 1963. Spores of mycorrhizal *endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46, 235–244. doi:doi:10.1016/S0007-1536(63)80079-0

- Giovannetti, M., Fortuna, P., Citernesi, A.S., Morini, S., Nuti, M.P., 2001. The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytol.* 151, 717–724. doi:10.1046/j.0028-646x.2001.00216.x
- Giovannetti, M., Mosse, B., 1980. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84, 489–500. doi:10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x
- Hart, M.M., Reader, R.J., 2002. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 153, 335–344. doi:10.1046/j.0028-646X.2001.00312.x
- Hetrick, B.A.D., Wilson, G.W.T., Cox, T.S., 1992. Mycorrhizal dependence of modern wheat varieties, landraces, and ancestors. *Can. J. Bot.* 70, 2032–2040. doi:10.1139/b92-253
- Jenkins, W.R., 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Dis. Rep.* 48, 692.
- Kapoor, R., Sharma, D., Bhatnagar, A.K., 2008. Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 116, 227–239. doi:10.1016/j.scienta.2008.02.002
- Kavoo-Mwangi, A.M., Kahangi, E.M., Ateka, E., Onguso, J., Mukhongo, R.W., Mwangi, E.K., Jefwa, J.M., 2013. Growth effects of microorganisms based commercial products inoculated to tissue cultured banana cultivated in three different soils in Kenya. *Appl. Soil Ecol.* 64, 152–162. doi:10.1016/j.apsoil.2012.12.002
- Kiers, E.T., Duhamel, M., Beesetty, Y., Mensah, J.A., Franken, O., Verbruggen, E., Fellbaum, C.R., Kowalchuk, G.A., Hart, M.M., Bago, A., Palmer, T.M., West, S.A., Vandenkoornhuyse, P., Jansa, J., Bücking, H., 2011. Reciprocal Rewards Stabilize Cooperation in the Mycorrhizal Symbiosis. *Science* 333, 880–882. doi:10.1126/science.1208473
- Koffi, M.C., Declerck, S., 2015. In vitro mycorrhization of banana (*Musa acuminata*) plantlets improves their growth during acclimatization. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 51, 265–273. doi:10.1007/s11627-015-9666-0
- Koltai, H., 2010. Mycorrhiza in floriculture: Difficulties and opportunities. *Symbiosis* 52, 55–63. doi:10.1007/s13199-010-0090-2
- Loges, V., Costa, A.S. da, Guimarães, W.N.R., Teixeira, M. do C.F., 2008. Potencial de mercado de bastão-do-imperador e sorvetão. *Rev. Bras. Hortic. Ornam.* 14, 15–22.
- Mendiburu, F., 2015. agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.2-2. Available at: <https://cran.r-project.org/web/packages/agricolae/index.html> (accessed 17.02.2016).
- Miachir, J.I., Romani, V.L.M., Amaral, A.F. de C., Mello, M.O., Crocomo, O.J., Melo, M., 2004. Micropropagation and callogenesis of *Curcuma zedoaria* Roscoe. *Sci. Agric.* 61, 427–432. doi:10.1590/S0103-90162004000400012
- Moreira, B.C., Mendes, F.C., Mendes, I.R., Paula, T.A., Prates Junior, P., Salomão, L.C.C., Stürmer, S.L., Otoni, W.C., Guarçoni M., A., Kasuya, M.C.M. The interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Piriformospora indica* improves the growth

- and nutrient uptake in micropropagation-derived pineapple plantlets. *Sci. Hortic.* (Amsterdam). 197, 183–192. doi:10.1016/j.scienta.2015.09.032
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497. doi:DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Newman, E.I., 1966. A method of estimating the total length of root in a sample. *J. Appl. Ecol.* 3, 139–145. doi:10.2307/2401670
- Novais, C.B. de, Borges, W.L., Jesus, E. da C., Saggin Júnior, O.J., Siqueira, J.O., 2014. Inter- and intraspecific functional variability of tropical arbuscular mycorrhizal fungi isolates colonizing corn plants. *Appl. Soil Ecol.* 76, 78–86. doi:10.1016/j.apsoil.2013.12.010
- Oliveira, J.R.G. de, Moraes, T.A. de L., Melo, N.F. de, Yano-Melo, A.M., 2010. Fungos micorrízicos arbusculares e rizobactérias promotoras de crescimento na aclimatização de *Zingiber spectabile*. *Bragantia* 69, 687–694. doi:10.1590/S0006-87052010000300021
- Oliveira, J.R.G. de, Morais, T.A. de L., Melo, N.F. de, Yano-Melo, A.M., 2011. Acclimatization of *Tapeinochilos ananassae* plantlets in association with arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 46, 1099–1104.
- Phillips, J.M., Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55, 158–161. doi:doi:10.1016/S0007-1536(70)80110-3
- R Core Team, 2015. R: A language and environment for statistical computing. Available at: <http://www.r-project.org/> (accessed 17.02.2016).
- Santos, R. dos, Girardi, C.G., Pescador, R., Stürmer, S.L., 2010. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus fertilization on *post vitro* growth of micropropagated *Zingiber officinale* Roscoe. *Rev. Bras. Cienc. do Solo* 34, 765–771. doi:10.1590/S0100-06832010000300018
- Sato, A.Y., Nannetti, D. de C., Pinto, J.E.B.P., Siqueira, O., Blank, M. de F.A., 1999. Fungos micorrízicos-arbusculares no desenvolvimento de mudas de helicônia e gérbera micropropagadas. *Hortic. Bras.* 17, 25–28. doi:10.1590/S0102-05361999000100007
- Silva, M.F. da, Pescador, R., Rebelo, R.A., Stürmer, S.L., 2008. The effect of arbuscular mycorrhizal fungal isolates on the development and oleoresin production of micropropagated *Zingiber officinale*. *Brazilian J. Plant Physiol.* 20, 119–130. doi:10.1590/S1677-04202008000200004
- Silva, M.A., Silva, F.S.B., Yano-Melo, A.M., Melo, N.F., Maia, L.C., 2006. Fungos micorrízicos arbusculares e vermicomposto na aclimatação de *Alpinia purpurata* (Viell.) Schum e *Zingiber spectabile* Griff. (Zingiberaceae). *Acta Bot. Brasilica* 20, 249–256. doi:10.1590/S0102-33062006000200001
- Smith, F.A., Grace, E.J., Smith, S.E., 2009. More than a carbon economy: Nutrient trade and ecological sustainability in facultative arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytol.* 182, 347–358. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02753.x

- Smith, F.A., Smith, S.E., 2011. What is the significance of the arbuscular mycorrhizal colonisation of many economically important crop plants? *Plant Soil* 348, 63–79. doi:10.1007/s11104-011-0865-0
- Smith, S.E., Read, D.J., 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd ed, Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, New York, London. 794p.
- Smith, S.E., Smith, F.A., 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 227–50. doi:10.1146/annurev-arplant-042110-103846
- Uma, E., Muthukumar, T., Sathiyadash, K., Muniappan, V., 2010. Mycorrhizal and dark septate fungal associations in gingers and spiral gingers. *Botany* 88, 500–511. doi:doi:10.1139/B10-021
- Voets, L., Providencia, I.E. de la, Declerck, S., 2006. Glomeraceae and Gigasporaceae differ in their ability to form hyphal networks. *New Phytol.* 172, 185–188. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01873.x
- Wen, S.-S., Cheng, F.-Y., Zhong, Y., Wang, X., Li, L.-Z., Zhang, Y.-X., Qiu, J.-M., 2016. Efficient protocols for the micropropagation of tree peony (*Paeonia suffruticosa* “Jin Pao Hong”, *P. suffruticosa* “Wu Long Peng Sheng”, and *P.xlemoinei* “High Noon”) and application of arbuscular mycorrhizal fungi to improve plantlet establishment. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 201, 10–17. doi:10.1016/j.scienta.2016.01.022
- Wong, W., 2008. Light up your Garden with a Torch Ginger [WWW Document]. URL <http://www.greenculturesg.com/archives.html> (accessed 3.11.15).
- Yadav, K., Aggarwal, A., Singh, N., 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) induced acclimatization, growth enhancement and colchicine content of micropropagated *Gloriosa superba* L. plantlets. *Ind. Crops Prod.* 45, 88–93. doi:10.1016/j.indcrop.2012.12.001
- Yano-Melo, A.M., Saggin Júnior, O.J., Lima-Filho, J.M., Melo, N.F. de, Maia, L.C., 1999. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the acclimatization of micropropagated banana plantlets. *Mycorrhiza* 9, 119–123. doi:10.1007/s005720050009
- Yunus, M.F., Aziz, M.A., Kadir, M.A., Rashid, A.A., 2012. In vitro propagation of *Etilingera elatior* (Jack) (torch ginger). *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 135, 145–150. doi:10.1016/j.scienta.2011.12.016

5. Estabelecimento em campo de plantas de bastão do imperador [*Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith] inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares

Angélica Ricarte da Silva^a, Danielle Karla Alves da Silva^b, Nataniel Franklin de Melo^c,
Adriana Mayumi Yano-Melo^{d*}

^a Laboratório de Microbiologia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, 56300-990, Petrolina, PE, Brasil.

^b Laboratório de Microbiologia, Bolsista DCR, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, 56300-990, Petrolina, Pernambuco, Brasil

^c Laboratório de Biotecnologia, Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semiárido, Embrapa Semiárido, 56302-970, Petrolina, PE, Brasil.

^d Laboratório de Microbiologia, Colegiado Acadêmico de Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, 56300-990, Petrolina, Pernambuco, Brasil

RESUMO

A espécie *Etilingera elatior*, conhecida como bastão do imperador, pertence à família Zingiberaceae e possui características peculiares, como folhagem intensa e inflorescência cerosa, semelhante a uma tocha. Esta planta é propagada tradicionalmente por meio de rizomas, o que facilita a proliferação de doenças, mas a cultura de tecidos e os fungos micorrízicos arbusculares podem ser utilizados como ferramenta biotecnológica para a produção e cultivo em larga escala desta planta. Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito da inoculação micorrízica associada à adubação com NPK sobre o estabelecimento de plantas micropropagadas de *Etilingera elatior* em condições de campo. Para isto, realizou-se experimento em delineamento em blocos casualizados em arranjo fatorial 2 x 2 (com e sem adubação x com e sem micorriza), com quatro blocos, contendo duas repetições por bloco, totalizando 32 parcelas. Após micropropagadas, as plantas foram aclimatizadas com e sem micorriza, conforme tratamentos de inoculação, e após 80 dias foram transplantadas para o campo, onde houve ou não adubação. Os resultados mostraram que houve efeito isolado dos tratamentos de inoculação micorrízica e de adubação e que, de modo geral, a adubação promoveu maior desenvolvimento das plantas. A inoculação micorrízica também beneficiou as plantas, com aumento da biomassa fresca, da área foliar e da quantidade de perfilhos por touceira das plantas. Conclui-se que a adubação NPK e inoculação com *G. albida* favorecem o desenvolvimento e estabelecimento de plantas de *E. elatior* em condições de campo.

Palavras-chave: micorriza arbuscular, desenvolvimento em campo, adubação, cultivo *ex vitro*.

5.1. Introdução

O bastão do imperador [*Etilingera elatior* (Jack) R.M. Sm.] é uma planta de clima tropical pertencente à família Zingiberaceae e conhecida como bastão do

imperador, flor da redenção e gengibre de tocha, entre outros. Apresenta características peculiares, sendo reconhecida pela sua folhagem e inflorescências com formato de roseta, as quais são bastante cerosas e semelhantes a uma tocha (BRAINER; OLIVEIRA, 2007). Esta planta é originária do sudeste da Ásia - Indonésia, Malásia e sul da Tailândia e mundialmente cultivada nos trópicos (LIM, 2014).

As espécies da família Zingiberaceae são utilizadas na medicina, culinária, ornamentação e paisagismo. São utilizadas várias partes da planta: folhas, haste, rizoma, brotações novas, flores e inflorescências, sementes e frutos para seus diversos fins, principalmente nos países asiáticos (CHAN; LIM; TAN, 2011; CHAN; LIM; WONG, 2011; LIM, 2014; MAIMULYANTI; PRIHADI, 2015).

Porém, estas plantas são propagadas vegetativamente por meio de rizomas, o que pode acarretar em proliferação de doenças (LOGES et al., 2008; WONG, 2008). Neste sentido, a micropropagação é uma técnica com diversas vantagens para estas plantas (NAIR, 2013), proporcionando sua multiplicação, com maior controle fitossanitário e em larga escala (FARIDAH et al., 2011; YUNUS et al., 2012).

Além disso, a interação desta ferramenta biotecnológica com microorganismos que beneficiam o desenvolvimento das plantas, como os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), por exemplo, pode proporcionar a realização de uma agricultura sustentável. Neste contexto, os FMA são considerados componentes bióticos ativos do solo e, portanto, devem ser utilizados visando o aumento da eficiência do funcionamento do ecossistema (BAREA, 2015; BERRUTI et al., 2016).

Estes fungos são bitróficos obrigatórios e realizam associação com cerca de 90% das espécies vegetais terrestres, havendo troca de nutrientes entre os simbiontes, principalmente carbono (C), da planta para o fungo, e fósforo (P), do fungo para a planta (SMITH; SMITH, 2011). As hifas dos FMA se estendem no solo a distância maiores do que as raízes, até 40 vezes mais, e são mais finas do que estas, aumentando a capacidade de absorção de nutrientes das plantas, beneficiando, portanto, o seu desenvolvimento (GIOVANNETTI et al., 2001; SMITH; READ, 2008). De acordo com Azcón-Aguilar e Barea (1997), a utilização destes fungos torna-se uma importante ferramenta biotecnológica, principalmente em culturas que passam por fase de mudas, como aquelas da horticultura em que as plantas são cultivadas em viveiros, vasos ou cultura de tecidos.

A utilização combinada de FMA e fertilizante químico ao solo pode contribuir para o aumento da disponibilidade de P e potássio (K) (SUBHASHINI, 2016), além do suprimento de macro e micronutrientes para as plantas (BERRUTI et al., 2016). Assim, a fim de se estabelecer uma produção segura, estável e ambientalmente sustentável na horticultura, os FMA têm sido aplicados e desempenhado papel fundamental como bioestimulantes, produzindo efeitos como biofertilizantes, bioprotetores e biorreguladores (ROUPHAEL et al., 2015).

No entanto, a alta disponibilidade de P pode inibir a associação micorrízica (BALZERGUE et al., 2013; SMITH; SMITH, 2011). Neste sentido, estudos têm revelado que há interação entre os nutrientes P e nitrogênio (N) na regulação da simbiose, podendo haver efeito inibitório da simbiose mediante aplicação destes nutrientes em níveis elevados (BONNEAU et al., 2013). Por outro lado, as plantas podem ser beneficiadas pela inoculação com FMA quando cultivadas com adição de nutrientes ao substrato, em que a aplicação de P com outros nutrientes pode reduzir seu efeito inibitório, como observado por Nouri et al. (2014) em plantas de *Petunia hybrida* inoculadas ou não com *Rhizophagus irregulares*.

O objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito da inoculação micorrízica associada à adubação com NPK sobre o estabelecimento de plantas micropropagadas de *Etilingera elatior* em condições de campo.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Local de estudo e delineamento experimental

O estudo foi realizado em viveiro localizado no Campo Experimental da Caatinga da Embrapa Semiárido, em Petrolina (Pernambuco, Brasil), na região do submédio Vale do São Francisco (9°04'17,48" S; 40°19'03,14" O). O viveiro possuía cobertura com sombrite (50%) e o solo era um Typic Haplustults, conforme classificação de Soil Survey Staff (2010). Amostras do solo foram previamente coletadas, antes da implantação do experimento e da adubação, apresentando as seguintes características físicas: com 76,9 dag Kg⁻¹ de areia; 21,5 dag Kg⁻¹ de silte; e 1,6 dag Kg⁻¹ de argila; e químicas: pH= 7,0; condutividade elétrica= 0,30 dS m⁻¹; P= 23,99 mg dm⁻³; K= 0,43 cmol_c dm⁻³; Ca= 3,8 cmol_c dm⁻³; Mg= 1,2 cmol_c dm⁻³; Na= 0,04 cmol_c dm⁻³; Al= 0,00 cmol_c dm⁻³; T= 5,47 cmol_c dm⁻³; V= 100%; matéria orgânica= 17,7 g Kg⁻¹.

O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados (DBC) em arranjo fatorial com dois tratamentos de adubação (com e sem adubação) e dois tratamentos de inoculação micorrízica (com e sem micorriza), com quatro blocos, contendo duas repetições por bloco, totalizando 32 parcelas. Os blocos foram separados por plantas de bordadura, bem como as extremidades da área experimental.

5.2.2. Adubação e condução do experimento

A partir da análise química do solo da área experimental, durante o experimento todas as adubações NPK foram adaptadas da recomendação agronômica para banana irrigada, conforme 2ª Aproximação (CAVALCANTI, 2008), aplicando-se apenas 50% da quantidade de N, P₂O₅ e K₂O do indicado para esta cultura, exceto para a quantidade de esterco, para o qual foi aplicado cerca de 17% (divido em duas aplicações, uma no plantio e outra, 30 dias após o plantio – DAP). Após abertura das covas (20 x 20 x 20 cm), sete dias antes do plantio das mudas foi realizada a adubação de fundação (somente nas parcelas dos tratamentos de adubação), aplicando-se 2,5 L cova⁻¹ de esterco e 30 g cova⁻¹ de P₂O₅ na forma de superfosfato simples (SS). A partir do 60º DAP foi aplicado por touceira apenas N e K₂O, na forma de sulfato de amônio e cloreto de potássio, respectivamente, tendo sido estas aplicações distribuídas a cada 30 dias. Em virtude da observação de sintomas de deficiência de cálcio (Ca) (baseado em FRAZÃO et al., 2013), a partir dos 120 dias de cultivo a quantidade de adubo adicionado por touceira foi reduzida de 50% do recomendado para banana irrigada para 33,33% e, além disso, exclusivamente aos 120 DAP foi aplicado juntamente com as fontes de N e K a mesma quantidade de Ca que fora adicionada com o SS (constituído de cerca de 10% de Ca) no plantio, visando reduzir os sintomas apresentados. Todas as adubações foram realizadas até os 210 DAP e o experimento foi retirado aos 240 DAP.

As plantas foram espaçadas entre si e entre linhas em 1,5 m x 1,0 m, respectivamente. Foi utilizado o método de irrigação localizada e instalado o sistema de microaspersão, com microaspersores estáticos (70 L/h) de 360º de ângulo de rega inseridos na linha lateral de irrigação, a 2 m acima do solo. O sistema foi instalado ao longo das linhas de cultivo, mantendo-se um microaspersor entre plantas.

5.2.3. Preparo das mudas

Plantas de bastão do imperador (*E. elatior*) cv. Red Torch foram cultivadas *in vitro*, em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), a partir de explantes de cerca de 1 cm da porção basal entre o sistema radicular e o caule contendo meristemas caulinares de brotos previamente cultivados *in vitro*. O meio MS foi suplementado com 3% (p/v) de sacarose e solidificado com 0,45% de ágar e 2,0 mg L⁻¹ de BAP. O material foi incubado a 25±2 °C, com fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) e intensidade luminosa em torno de 35 μmol m⁻² s⁻¹.

Após a multiplicação *in vitro*, plântulas com padrão de altura semelhante foram selecionadas aleatoriamente para serem aclimatizadas em casa de vegetação. As raízes foram lavadas em água corrente para remover o excesso do meio de cultura e as plântulas foram transplantadas para vasos de polietileno (11,5 cm de altura x 13,5 cm de diâmetro maior x 9 cm de diâmetro menor) preenchidos com 600 mL de substrato a base de areia:vermiculita (1:1 v/v), o qual foi previamente esterilizado a 121 °C e 1 atm durante uma hora. No momento do transplante, foi realizada a inoculação com a espécie de FMA *Gigaspora albida*, na forma de solo-inóculo (contendo glomerosporos, fragmentos de raízes colonizadas e hifas de FMA), depositado diretamente sobre as raízes, padronizando-se 1.500 propágulos infectivos cm⁻³, nos respectivos vasos dos tratamentos de inoculação micorrízica.

Visando equilibrar a microbiota do substrato, todas as plantas foram suplementadas com 2,0 mL de um filtrado (isento de FMA) preparado a partir do peneiramento, em peneira de 45 μm, da diluição do inóculo (1.500 propágulos infectivos cm⁻³ do inóculo em 100 mL de água destilada). A irrigação foi feita com água destilada, e, uma vez por semana, foi substituída por 40 mL de solução nutritiva preparada com sais MS com 50% de sua concentração padrão.

Ao final de 80 dias de aclimatização as plantas foram transplantadas para o viveiro com 42±7,2% de colonização micorrízica, onde foram cultivadas durante 240 dias. No momento do transplante as plantas micorrizadas e as não micorrizadas apresentavam, em média, altura de 35,73±4,31 cm e 31,23±2,13 cm, respectivamente.

5.2.4. Inóculo de FMA

Foi utilizado o inóculo de FMA *G. albida* [URM FMA 11], provindo do banco de inóculos da Universidade Federal de Pernambuco (Recife/PE). Nesta instituição, o inóculo foi multiplicado em casa de vegetação no período de setembro a dezembro de 2014, utilizando-se o substrato à base de solo esterilizado: areia (1:1, v/v) e o milho (*Zea mays* L.) como planta multiplicadora; e apresentava 8,8 glomerosporos g⁻¹ de solo e 170 propágulos cm⁻³ de substrato. Os glomerosporos foram extraídos do substrato pela técnica de peneiramento úmido (GERDEMANN; NICOLSON, 1963) e centrifugação em água e sacarose (JENKINS, 1964; modificado com 50% de sacarose), e posteriormente quantificados em plana canaletada com o auxílio do estereomicroscópio. A quantificação do número mais provável (NMP) de propágulos infectivos de FMA (propágulos cm⁻³ de substrato) foi feita pela técnica de Feldmann e Idczak (1994), a partir de diluições do inóculo em tubetes com capacidade aproximada de 250 mL de substrato, as quais foram realizadas na ordem de 0, 1/10, 1/100 e 1/1000, em cinco repetições, com areia lavada esterilizada, utilizando-se o milho como planta teste, cujas raízes foram clarificadas e coradas pela técnica de Phillips e Hayman (1970), após 30 dias, para análise da presença de colonização micorrízica, cujos dados foram confrontados com a tabela de Cochran (1950).

5.2.5. Variáveis analisadas

Ao final do experimento as plantas foram avaliadas quanto à altura, área de ocupação da touceira, taxa de ocupação da parcela, biomassa fresca da parte aérea, área foliar, número de perfilhos, índices de clorofila a, b e total e percentual de colonização micorrízica.

A altura foi medida com auxílio de trena de 3 m. A área de ocupação da touceira (AOT; equação 1) e a taxa de ocupação da parcela (TOP; equação 2) foram determinadas conforme Costa et al. (2006).

$$AOT = L_t \times L_l \quad (1)$$

$$TOP = \frac{AOT}{AP} \times 100 \quad (2)$$

Em que: L_t e L_l correspondem às distâncias entre touceiras na linha e entre linhas, respectivamente; e AP é a área da parcela (1,5 m x 1,0 m).

A biomassa fresca da parte aérea (folhas e pseudocaule) foi determinada, com auxílio de balança digital, a partir do corte da touceira ao nível do solo, para a qual não foram considerados os perfilhos que ainda não apresentavam, pelo menos, uma folha completamente expandida. Já a contagem do número de perfilhos foi realizada considerando todas as brotações visíveis na touceira. Para a estimação da área foliar foi utilizado o equipamento LI-COR 3100 AREA METER e para os índices de clorofila, medidor eletrônico de teor de clorofila clorofiLOG CFL1030 (Falker®).

Para o percentual de colonização micorrízica as raízes foram lavadas em água corrente de torneira, secas a temperatura ambiente (cerca de 28 °C) por aproximadamente uma hora, a partir das quais retirou-se uma amostra de 0,5 g. O processamento foi seguido por diafanização em KOH (10%) durante 24 horas e clarificação em H₂O₂ (10%) + KOH (10%) (1:1 v/v) durante 5 minutos, depois as raízes coradas com azul de trypan (0,05%) em lactoglicerol por período de quatro horas (PHILLIPS; HAYMAN, 1970 modificado). Após o processamento, as raízes foram levadas ao estereomicroscópio para quantificação do percentual de colonização micorrízica pela técnica da intersecção de quadrantes, em que foram observadas 100 intersecções (GIOVANNETTI; MOSSE, 1980).

Além disso, foi calculado o incremento (I%) da biomassa fresca da parte aérea, da área foliar e do número de perfilhos por touceira resultante da adubação ou da inoculação com FMA, a partir da equação 3 (WEBER et al., 2004), em que: T_c é a média do tratamento com Adubação ou Micorriza e T_s é a média do tratamento sem Adubação ou Micorriza.

$$I(\%) = \left[\left(\frac{T_c - T_s}{T_s} \right) \times 100 \right] \quad (3)$$

5.2.6. Análise estatística

Os dados foram submetidos aos testes de normalidade dos resíduos de Shapiro-Wilk e de homocedasticidade de Bartlett a 5% de significância. Após estes, os dados de número de perfilhos e percentual de colonização micorrízica foram transformados, respectivamente, para \sqrt{x} e $\log(x)$. Para as demais variáveis os dados não necessitaram de transformação. Em seguida, foi realizada análise de

variância ($p \leq 0,05$), considerando o DBC em arranjo fatorial, seguida de teste de Tukey para comparação múltipla das médias com diferença significativa entre os tratamentos. Além disso, foram calculados os coeficientes de correlação linear de Pearson para as variáveis estudadas, a 5% de significância.

Estas análises foram realizadas com auxílio dos pacotes *ExpDes.pt* (FERREIRA; NOGUEIRA; ALVES, 2013) e *agricolae* (MENDIBURU, 2015), utilizando o software R versão 3.2.5 (R CORE TEAM, 2016).

5.3. Resultados e Discussão

A partir da análise de variância dos dados foi constatado efeito isolado dos tratamentos de adubação e micorriza sobre o estabelecimento e produção de plantas de *E. elatior* em campo (Tabela 1).

Com exceção da área de ocupação da touceira, da taxa de ocupação da parcela e do percentual de colonização micorrízica, a adubação influenciou positivamente o desenvolvimento das plantas no campo (Tabela 1). Efeito da inoculação com *G. albida* sobre o crescimento de *E. elatior* foi significativamente superior na biomassa fresca da parte aérea, área foliar e número de perfilhos (Tabela 1). Quando as plantas foram adubadas, o incremento sobre a biomassa fresca da parte aérea, a área foliar e o número de perfilhos por touceira foi, respectivamente, 110,78%, 95,77% e 82,10%, em relação às não adubadas. Por outro lado, quando micorrizadas, este incremento foi de 22,75%, 14,78% e 15,30%, respectivamente.

O incremento devido à micorriza sobre o crescimento das plantas pode ser favorecido com o aumento dos níveis de P ao solo (FROSI et al., 2016). No presente estudo não foi constatado efeito de interação entre os fatores e a adubação aumentou o crescimento das plantas mais do que a inoculação micorrízica.

Para plantas de tabaco o efeito da inoculação com FMA (*Glomus intraradices*) sobre a biomassa seca da planta, em relação ao tratamento controle (sem adição de FMA e fertilizante), foi observado somente quando esta foi realizada conjuntamente com adubação NPK, observando-se aumento da disponibilidade de P e K ao solo (SUBHASHINI, 2016). Porém, no presente estudo, o efeito foi isolado, sendo, portanto, recomendada a utilização de FMA como alternativa à adubação, visando principalmente a redução de custos e da dependência da utilização de agroquímicos para execução de uma agricultura sustentável, porém este potencial dos FMA não

tem sido completamente aproveitado pelos agricultores (BERRUTI et al., 2016). Além disso, é possível realizar o uso combinado de FMA e adubação química, tendo em vista os benefícios destes fatores sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas em condições de campo e o uso mais eficiente da fertilização do solo (CELY et al., 2016).

Assim como não houve efeito dos tratamentos sobre o percentual de colonização micorrízica, esta variável não apresentou nenhuma correlação significativa com as demais (Tabela 2). Além disso, foi constatada correlação linear positiva significativa de 79% a 92% entre as variáveis que tiveram efeito da adubação e micorriza (biomassa fresca, área foliar e número de perfilhos). No presente estudo, *G. albida* previamente inoculado não apresentou capacidade de competição superior aos FMA autóctones para colonizar as raízes, o que foi constatado independente da adição de fertilizante. Por outro lado, Nouri et al. (2014) observaram que pode haver influência da adição de nutrientes sobre a colonização micorrízica de *Petunia hybrida* com o FMA *Rhizophagus irregulares*. Estes autores constataram que o P e o N foram os elementos que influenciaram a associação micorrízica, podendo estes promover efeitos negativos sobre a simbiose, enquanto não houve efeito do Mg, Ca e Fe. Os autores observaram, ainda, que a carência de nutrientes pode desencadear um sinal devido à micorriza que neutraliza o efeito inibitório de altas concentrações do P.

Nos tratamentos sem FMA as plantas tiveram cerca de 50% de colonização, mostrando haver uma comunidade de FMA ativa no solo, capaz de colonizar o sistema radicular das plantas a uma taxa semelhante daquelas previamente colonizadas (cerca de 45%). Enfatiza-se, ainda, que a concentração de P no solo do presente estudo ($23,99 \text{ mg dm}^{-3}$) não inibiu a associação micorrízica pelos FMA nativos e nem reduziu aquela apresentada pelas plantas quando foram transplantadas para o campo ($42 \pm 7,2\%$), da mesma forma como observado em estudo com soja e algodão, em solo com disponibilidade moderada de P (12 a 17 mg dm^{-3}) (CELY et al., 2016).

Tabela 1 – Efeito dos fatores Adubação, Micorriza e sua interação sobre o estabelecimento e desenvolvimento de plantas micropropagadas de *E. elatior* após 240 dias de cultivo em campo.

<i>Tratamento</i>	Altura -- m --	Área de ocupação da touceira -- m ² --	Taxa de ocupação da parcela --- % ---	Biomassa fresca da parte aérea -- Kg --	Área foliar ---- cm ² ----	Número de perfilhos*	Clorofila a -----	Clorofila b -----	Clorofila Total -----	Colonização micorrízica** ---- % ----
Adubação										
Adubado	2,75 a	0,73 a	48,53 a	7,04 a	85.102,0 a	27,88 a	40,03 a	19,70 a	59,63 a	44,19 a
Não Adubado	2,48 b	0,80 a	53,50 a	3,34 b	43.470,8 b	15,31 b	38,87 b	16,23 b	54,97 b	51,00 a
Micorriza										
Micorrizado	2,62 A	0,75 A	49,99 A	5,72 A	68.710,6 A	23,13 A	39,49 A	17,57 A	57,06 A	44,63 A
Não Micorrizado	2,61 A	0,78 A	52,04 A	4,66 B	59.862,2 B	20,06 B	39,41 A	18,36 A	57,54 A	50,56 A
Fator	Nível de significância^a									
Adubação	<0,001	ns	ns	<0,001	<0,001	<0,001	0,034	0,009	0,012	ns
Micorriza	ns	ns	ns	0,021	0,009	0,033	ns	ns	ns	ns
Adubação x Micorriza	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	6,35	16,85	16,85	23,32	13,07	8,41	3,72	19,20	8,53	9,72

Médias observadas seguidas da mesma letra minúscula e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre os tratamentos de Adubação e Micorriza, respectivamente, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Dados transformados para \sqrt{x}

**Dados transformados para $\log(x)$

^a ns: não significativo ao nível de significância de 0,05.

Tabela 2 – Coeficientes de correlação linear de Pearson entre as variáveis altura (ALT), área de ocupação da touceira (AOT), biomassa fresca da parte aérea (BFA), área foliar (AF), número de perfilhos (NP), índices de clorofila a (Cl_a), b (Cl_b) e total (Cl_T) e percentual de colonização micorrízica (CM) após 240 dias de cultivo de *E. elatior* em campo.

	AOT	TOP	BFA	AF	NP	Cl _a	Cl _b	Cl _T	CM
ALT	-0,59*	-0,59*	0,78*	0,77*	0,56*	0,32 ^{ns}	0,37 ^{ns}	0,36 ^{ns}	0,17 ^{ns}
AOT		1,00	-0,41*	-0,34 ^{ns}	-0,32 ^{ns}	-0,13 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	-0,05 ^{ns}
TOP			-0,41*	-0,34 ^{ns}	-0,32 ^{ns}	-0,13 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	-0,05 ^{ns}
BFA				0,92*	0,79*	0,37*	0,44*	0,42*	0,19 ^{ns}
AF					0,86*	0,36*	0,43*	0,42*	0,05 ^{ns}
NP						0,26 ^{ns}	0,39*	0,36*	-0,09 ^{ns}
Cl _a							0,90*	0,95*	-0,09 ^{ns}
Cl _b								0,98*	-0,07 ^{ns}
Cl _T									-0,09 ^{ns}

*: significativo a 5% de probabilidade pelo teste T. ^{ns}: não significativo a 5% de probabilidade.

5.4. Conclusões

Plantas de *Etilingera elatior* cultivadas *in vitro* podem ser estabelecidas em campo com sucesso tanto quando pré-inoculadas com *Gigaspora albida* como quando adubadas com NPK, não havendo sinergismo benéfico ao desenvolvimento da planta na utilização de ambos os fatores. Além disso, mesmo competindo com os FMA autóctones, *G. albida* pode aumentar o desempenho de *E. elatior* quanto à biomassa fresca da parte aérea, área foliar e a produção de perfilhos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo suporte financeiro; à Embrapa Semiárido (e equipe do Laboratório de Biotecnologia, especialmente Ângela Katiussia Nascimento dos Santos Coelho e Elenício Gomes Coelho) e à Universidade Federal do Vale do São Francisco (e equipe do Laboratório de Microbiologia Geral/CCA) pelo suporte para execução dos experimentos.

Referências Bibliográficas

AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J. M. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: Significance and potentials. **Scientia Horticulturae**, v. 68, n. 1-4, p. 1–24, 1997.

BAREA, J. M. Future challenges and perspectives for applying microbial biotechnology in sustainable agriculture based on a better understanding of plant-microbiome interactions. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 15, n. 2, p. 261–282, 2015.

BALZERGUE, C. et al. High phosphate reduces host ability to develop arbuscular mycorrhizal symbiosis without affecting root calcium spiking responses to the fungus. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 426, p. 1-15, 2013.

BERRUTI, A. et al. Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Natural Biofertilizers: Let's Benefit from Past Successes. **Frontiers in Microbiology**, v.6, n. 1559, p. 1-13, 2016.

BONNEAU, L. et al. Combined phosphate and nitrogen limitation generates a nutrient stress transcriptome favorable for arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Medicago truncatula*. **New Phytologist**, v. 199, p. 188–202, 2013.

BRAINER, M. S. C. P.; OLIVEIRA, A. A. P. **Floricultura: perfil da atividade no nordeste brasileiro**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2007.

CAVALCANTI, F. J. A. **Recomendações de adubação para o Estado de Pernambuco: 2ª aproximação**. 3 ed. revisada. Recife: Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA, 2008. 212 p.

CELY, M. V. T. et al. Inoculant of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (*Rhizophagus clarus*) Increase Yield of Soybean and Cotton under Field Conditions. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 720, p. 1-9, 2016.

- CHAN, E. W. C.; LIM, Y. Y.; TAN, S. P. Standardised herbal extract of chlorogenic acid from leaves of *Etilingera elatior* (Zingiberaceae). **Pharmacognosy research**, v. 3, n. 3, p. 178–184, 2011.
- CHAN, E.; LIM, Y. Y.; WONG, S. K. Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Etilingera elatior*: A Review. **Pharmacognosy Journal**, v. 3, n. 22, p. 6–10, 2011.
- COCHRAN, W. G. Estimation of bacterial densities by means of the most probable number. **Biometrics**, v. 6, p. 105–116, 1950.
- COSTA, A. S. Perfilamento e expansão de touceiras de helicônias. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n.4, p. 460-463, 2006.
- FARIDAH, Q. Z. et al. Efficient *in vitro* regeneration of *Zingiber zerumbet* Smith (a valuable medicinal plant) plantlets from rhizome bud explants. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 46, p. 9303–9308, 2011.
- FERREIRA, E. B.; NOGUEIRA, P. P.; ALVES, C. D. **ExpDes.pt: Experimental Designs package**, 2013. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/package=ExpDes.pt>>. Acesso em: 16 jun. 2016.
- FELDMANN, F.; IDCZAK, E. Inoculum production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for use in tropical nurseries. In: NORRIS, J. R.; READ, D. J.; VARMA, A. K. (Eds.). **Techniques for mycorrhizal research**. San Diego: Academic Press, 1994. p. 799–817.
- FRAZÃO, D. A. C. et al. Visual characterization, growth parameters, and nutritional consequences promoted by nutrient omissions in young *Etilingera elatior* plants. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v.11, n. 2, p. 1470-1474, 2013.
- FROSI, G. et al. Increase in biomass of two woody species from a seasonal dry tropical forest in association with AMF with different phosphorus levels. **Applied Soil Ecology**, v. 102, p. 46–52, 2016.
- GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of British Mycological Society**, v. 46, n. 2, p. 235–244, 1963.
- GIOVANNETTI, M. et al. The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. **New Phytologist**, v. 151, n. 3, p. 717–724, 2001.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v. 84, n. 3, p. 484–500, 1980.
- JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, v. 48, p. 692, 1964.
- LIM, T. K. *Etilingera elatior*. In: LIM, T. K. (Ed.). **Edible Medicinal and Non Medicinal Plants**. 1. ed. [s.l.] Springer Netherlands, 2014. v. 8, p. 834–843.
- LOGES, V. et al. Potencial de mercado de bastão-do-imperador e sorvetão. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 14, n. 1, p. 15–22, 2008.
- MAIMULYANTI, A.; PRIHADI, A. R. Chemical Composition, Phytochemical and Antioxidant Activity from Extract of *Etilingera Elatior* Flower from Indonesia. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 3, n. 6, p. 233–238, 2015.
- MENDIBURU, F. **agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research**. R package version 1.2-2, 2015. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>>. Acesso em

16 jun. 2016.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473–497, 1962.

NAIR, K. P. P. The Biotechnology of Ginger. In: NAIR, K. P. P. (Ed.). **The Agronomy and Economy of Turmeric and Ginger: The Invaluable Medicinal Spice Crops**. 1. ed. [s.l.], Elsevier, 2013. p. 375-400.

NOURI, E. et al. Phosphorus and Nitrogen Regulate Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis in *Petunia hybrida*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, e90841, p. 1-14, 2014.

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of British Mycological Society**, v. 55, p. 158–161, 1970.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2016. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>. Acesso em: 16 jun. 2016.

ROUPHAEL, Y. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi act as biostimulants in horticultural crops. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 91–108, 2015.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**. 3rd ed. New York, London: Academic Press, 2008. 794p.

SMITH, S. E.; SMITH, F. A. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. **Annual review of plant biology**, v. 62, p. 227–50, 2011.

SOIL SURVEY STAFF. **Keys to Soil Taxonomy**, 11th ed. Washinton, DC: USDA-Natural Resources Conservation Service, 2010. 338p.

SUBHASHINI, D. V. Effect of NPK Fertilizers and Co-inoculation with Phosphate-solubilizing Arbuscular Mycorrhizal Fungus and Potassium-Mobilizing Bacteria on Growth, Yield, Nutrient Acquisition, and Quality of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Communications in soil science and plant analysis**, v. 47, n. 3, p. 328-337, 2016.

WEBER, O. B. et al. Inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada em mudas de cajueiro-anão-precoce. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 39, n. 5, p. 477-483, 2004.

WONG, W. **Light up your Garden with a Torch Ginger**. Singapore Green Culture, Singapore, 2008. Disponível em: <<http://www.greenculturesg.com/archives.html>>. Acesso em 11 mar. 2015.

YUNUS, M. F. et al. In vitro propagation of *Etilingera elatior* (Jack) (torch ginger). **Scientia Horticulturae**, v. 135, p. 145–150, 2012.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em virtude das diversas aplicações que plantas de Bastão do Imperador (*Etilingera elatior*) apresentam é evidente a importância de estudos que visem o seu estabelecimento e produção. Assim, a cultura de tecidos vegetais exibe clara função como alternativa para a propagação de plantas, principalmente as tropicais, dadas as limitações do método convencional de propagação. Uma vez observado o papel fundamental que os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) desempenham na produção vegetal, este trabalho possui relevância e se apresenta como inovador, visto que é o primeiro registro da utilização desses fungos sobre o cultivo *ex vitro* de *E. elatior*. Foi possível comprovar que estas plantas precisam ser inoculadas com FMA na fase de aclimatização, os quais beneficiam estas plantas no crescimento em campo, auxiliando sua obtenção em maior escala e com maior desempenho no seu estabelecimento visando a produção em campo.

ANEXO 1

Artigo: Micropropagação e aclimatização de plântulas de *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith: uso de diferentes fitohormônios e substratos



Figura 1 – Explante de 1 cm, com meristema caulinar de brotos de *E. elatior* cultivados *in vitro*.



Figura 2 – Inoculação de explantes de *E. elatior* em meio de cultivo MS suplementando ou não com BAP e/ou AIB.



Figura 3 – Micropropagação de *E. elatior* em meio de cultura MS suplementando ou não com BAP e/ou AIB.



Figura 4 – Aclimatização de plântulas micropropagadas de *E. elatior* em substrato à base de areia:Plantmax® (2:1, v/v; à esquerda) e areia:vermiculita (1:1, v/v; À direita).

ANEXO 2

Artigo: Aclimatização de Plantas Micropropagadas de *Etilingera elatior* (Jack) R. M. Inoculadas com Fungos Micorrízicos Arbusculares



Figura 5 – Transplântio de plântulas micropropagadas de *E. elatior* para substrato à base de areia:vermiculita (1:1, v/v) submetidas ou não a inoculação *C. etunicatum* e/ou *G. albida*.



Figura 6 – Aclimatização de plântulas de *E. elatior* em casa de vegetação 15 dias após inoculação com *C. etunicatum* e/ou *G. albida*.



Figura 7 – Aclimatização de plântulas de *E. elatior* em casa de vegetação 30 dias após inoculação com *C. etunicatum* e/ou *G. albida*.



Figura 8 – Aclimatização de plântulas de *E. elatior* em casa de vegetação 45 dias após inoculação com *C. etunicatum* e/ou *G. albida*.



Figura 9 – Aclimatização de plântulas de *E. elatior* em casa de vegetação 60 dias após inoculação com *C. etunicatum* e/ou *G. albida*.



Figura 10 – Plantas de *E. elatior* não inoculadas (NI) com *C. etunicatum* e/ou *G. albida*, após 60 de cultivo em casa de vegetação.



Figura 11 – Plantas de *E. elatior* inoculadas com *C. etunicatum* (Ce), após 60 de cultivo em casa de vegetação.



Figura 12 – Plantas de *E. elatior* inoculadas com *G. albida* (Ga), após 60 de cultivo em casa de vegetação.



Figura 13 – Plantas de *E. elatior* inoculadas com *C. etunicatum* e *G. albida* (Ga), após 60 de cultivo em casa de vegetação.

ANEXO 3

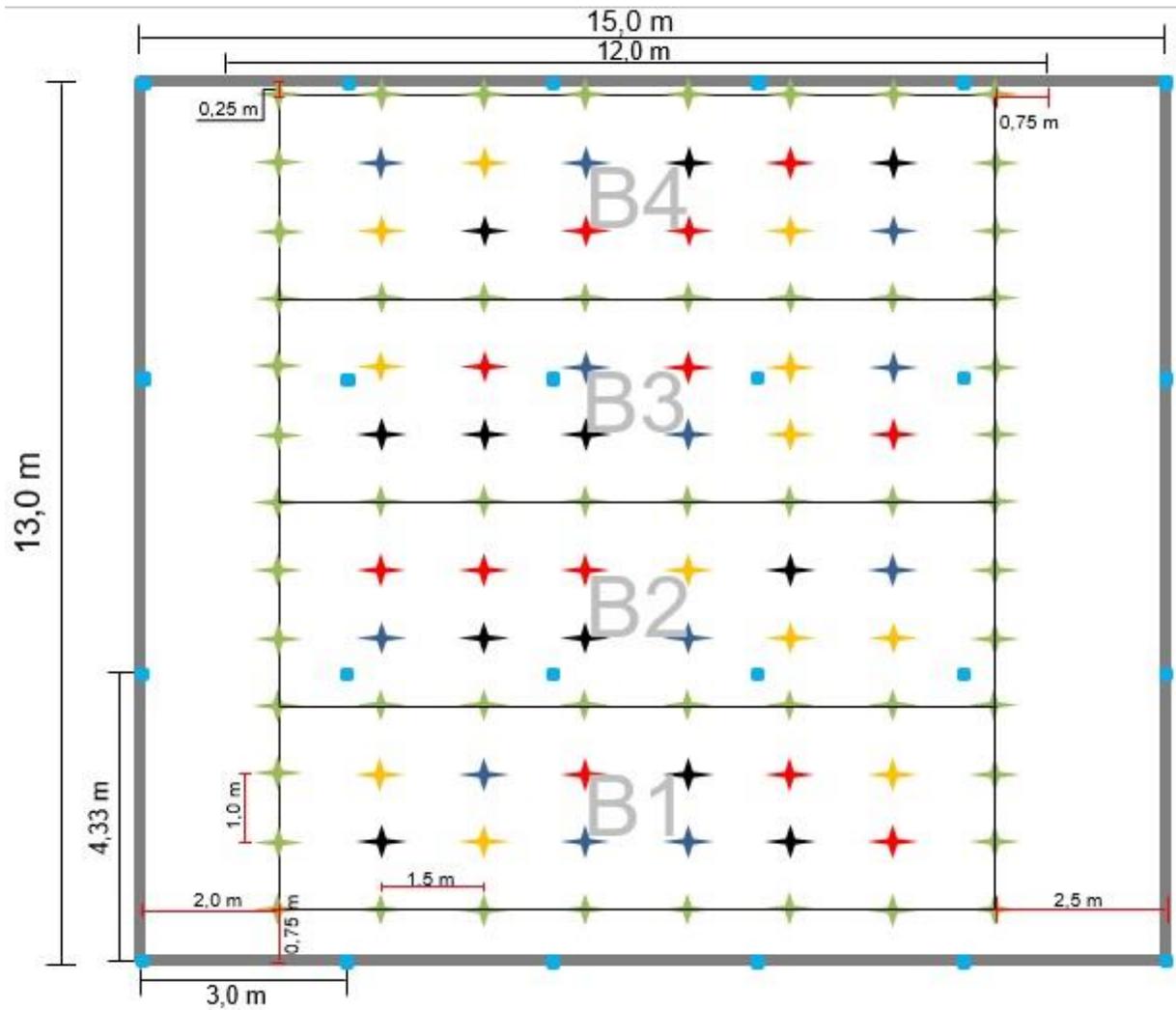
Artigo: Estabelecimento em campo de plantas de bastão do imperador [*Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith] inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares



Figura 14 – Plantas micropropagadas de *E. elatior* após 80 dias de aclimatização em casa de vegetação, inoculadas ou não com *G. albida*.



Figura 15 – Abertura de covas (20 x 20 x 20 cm) para cultivo de plantas micropropagadas de *E. elatior* em viveiro (50% de sombreamento).



Legenda:

★ : Plantas de bordadura

★ : Plantas do tratamento 1 (T1)

★ : Plantas do tratamento 2 (T2)

★ : Plantas do tratamento 3 (T3)

★ : Plantas do tratamento 4 (T4)

□ : Bloco

■ : pilares do viveiro

Tratamentos:

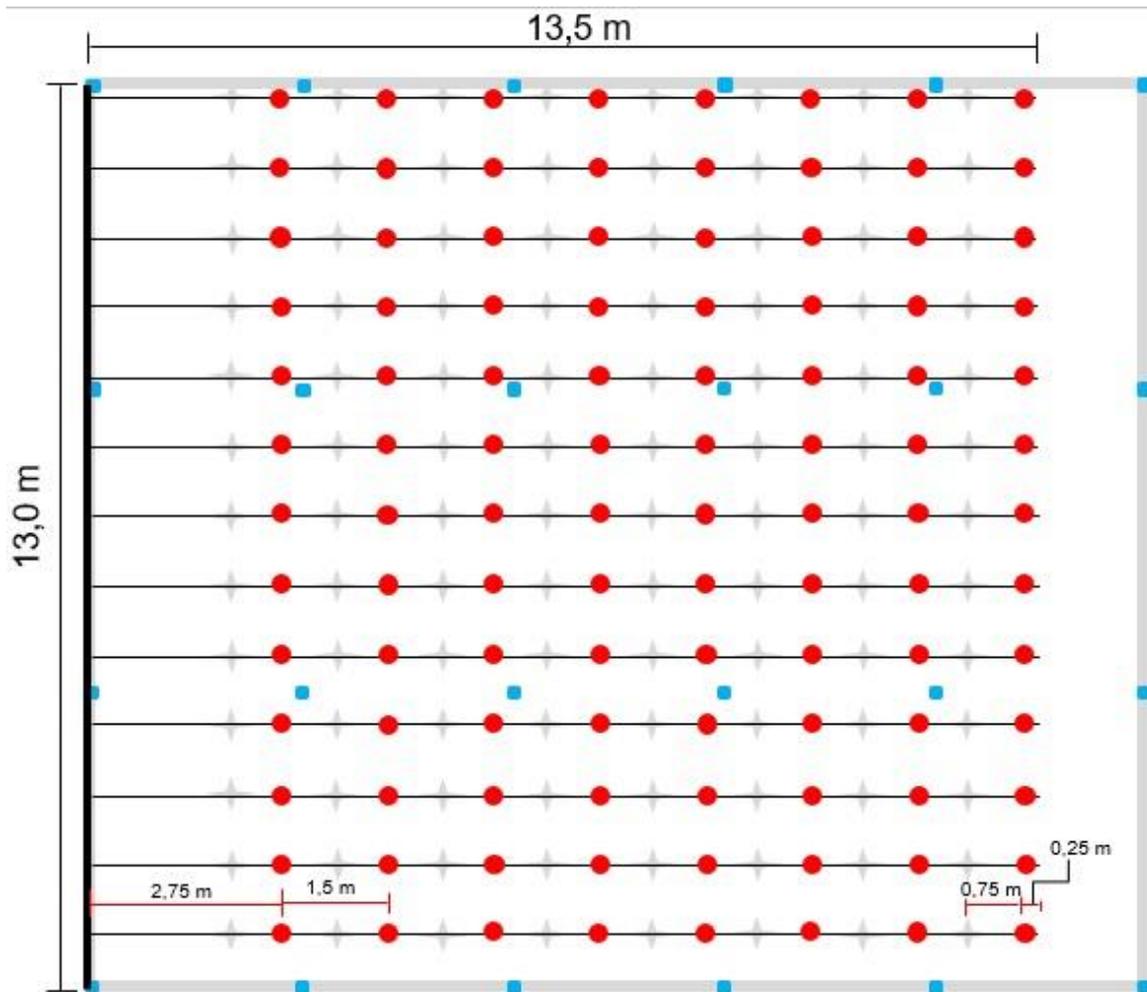
T1: Controle – não adubado (NA) e não micorrizado (NM)

T2: Adubado (A) + NM

T3: NA + Micorrizado (M)

T4: A + M

Figura 16 – Croqui experimental para cultivo em campo de plantas micropropagadas de *E. elatior* submetidas ou não a tratamentos de adubação NPK e/ou inoculação com *G. albida*.



Legenda:

- ┃ : Linha secundária do sistema de irrigação (13,0 m)
- | : Linha lateral do sistema de irrigação (13,5 m)
- : Microaspersor (1 micro por planta, inserido entre plantas, a cada 1,5 m)
- ★ : Plantas
- : Pilares do viveiro
- : Área útil do sistema de irrigação (13,0 m x 13,5 m)

Figura 17 – Croqui do sistema de irrigação para cultivo em campo de plantas micropropagadas de *E. elatior* submetidas ou não a tratamentos de adubação NPK e/ou inoculação com *G. albida*.



Figura 18 – Mudanças micropropagadas de *E. elatior* previamente inoculadas ou não com *G. albida* transplantadas para viveiro, após 80 de cultivo em casa de vegetação.



Figura 19– Microaspersor estático (70 L/h) de 360° de ângulo de rega, inserido na linha lateral de irrigação, a 2 m acima do solo.



Figura 20 – Irrigação de plantas de *E. elatior* cultivadas em viveiro.



Figura 21 – Plantas de *E. elatior* previamente inoculadas ou não com *G. albida* e/ou adubadas ou não com NPK após 240 dias de cultivo em viveiro.



Figura 22 – Análise de teor de clorofila em plantas de *E. elatior* após 240 dias de cultivo em viveiro.

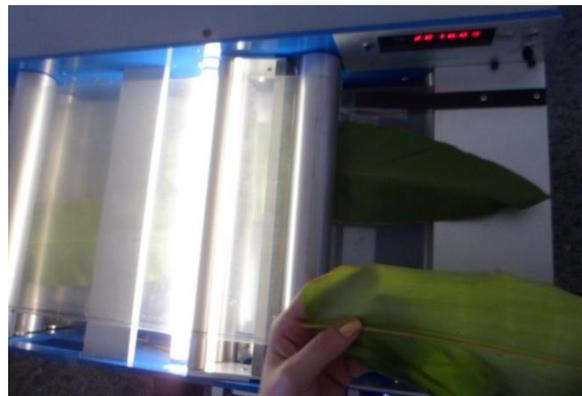
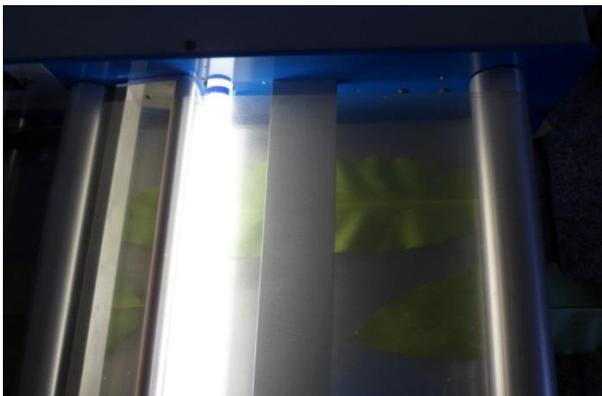


Figura 23 – Análise de área foliar de plantas de *E. elatior* após 240 dias de cultivo em viveiro.